

Experimentelle Untersuchungen zur Funktion von Aquaporin 1 in der Pathogenese der Osteoarthrose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ina Kramm, geb. Kindermann

aus Wismar

Gießen 2014

Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie der

Justus-Liebig Universität Gießen

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Ulf Müller-Ladner

Gutachter: Prof. Dr. Müller-Ladner

Gutachter: Prof. Dr. Rickert

Tag der Disputation: 01.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Osteoarthrose	1
1.2	Aufbau des hyalinen Gelenkknorpels	3
1.2.1	Chondrozyten	4
1.2.2	Zusammensetzung der extrazellulären Matrix	5
1.2.3	Die Knorpelmatrix im dynamischen Gleichgewicht	8
1.2.4	Einblick in molekularbiologische Prozesse der Osteoarthroseentstehung	10
1.2.5	Periostin	14
1.3	Aquaporin 1	15
1.3.1	Struktur	15
1.3.2	Lokalisation	18
1.3.3	Funktionen	18
1.3.4	Aquaporin 1 und Osteoarthrose	20
1.4	Fragestellung der Dissertation	21
2	Material	23
2.1	Verwendete Gewebe	23
2.1.1	Humanes Knorpelgewebe	23
2.1.2	Murines Nierengewebe	23
2.2	Chemikalien	24

2.3	Medien	26
2.4	Lösungen und Puffer	27
2.5	Anwendungspakete (Kits)	29
2.6	Verbrauchsmaterialien	30
2.7	Antikörper	31
2.8	Enzyme	32
2.9	Bakterien	33
2.10	Plasmide	33
2.11	Oligonukleotide	34
2.12	Geräte	36
2.13	Computerprogramme	37
3	Methoden	38
3.1	Zellbiologische Methoden	38
3.1.1	Gewebeentnahme	38
3.1.2	Kryokonservierung	39
3.1.3	Chondrozytenisolierung	39
3.1.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	40
3.1.5	Chondrozytenkultivierung als Monolayer	40
3.1.6	Transfektion der Chondrozyten	40
3.2	Immunologische Methoden	42
3.2.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	42
3.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	42

3.2.3	Immunhistochemie	43
3.2.4	Immunzytochemie	44
3.3	Mikrobiologische Methoden	45
3.3.1	Bakterienkultivierung	45
3.3.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	45
3.3.3	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	46
3.4	Molekularbiologische Methoden	47
3.4.1	Plasmidisolierung	47
3.4.2	RNA-Isolierung	48
3.4.3	Reverse Transkription	49
3.4.4	Polymerase Kettenreaktion	50
3.4.5	Quantitative Real-Time PCR	51
3.4.6	Restriktionsverdau	53
3.4.7	Ligation	54
3.4.8	Agarose-Gelelektrophorese	55
3.4.9	DNA-Sequenzierung	55
3.5	Proteinchemische Methoden	56
3.5.1	Zellpräparation und Zelllyse	56
3.5.2	Quantitative Proteinbestimmung mittels	
	Bicinchoninsäure-Assay	56
3.5.3	Proteinauftrennung mittels	
	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
3.4.5	Western Blot	58

3.5.5	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	60
3.6	Statistische Methoden	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Immunhistochemische Expressionsanalysen	62
4.1.1	Aquaporin 1	62
4.1.2	Periostin	63
4.2	Analyse des Knockdowns von Aquaporin 1	64
4.2.1	Der Knockdown von Aquaporin 1 in der Immunzytologie	64
4.2.2	Western Blot-Analyse	69
4.2.3	Der Knockdown von Aquaporin 1 in der qRT-PCR und seine Auswirkungen auf die Expression ausgewählter chondrozytärer Stoffwechselfparameter	72
4.3	Überexpression von Aquaporin 1	74
4.3.1	Amplifizierung von Aquaporin 1 in der PCR	74
4.3.2	Sequenzierung des PCR-Produktes	76
4.3.3	Klonierungsverlauf mit verschiedenen Vektoren	77
4.3.3.1	Klonierungsversuch mit dem pQE-TriSystem	77
4.3.3.2	Zwischenklonierung in pBlueScript KS II (+)	80
4.3.3.3	TA-Klonierung mit dem pGEM [®] -T Easy Vektor	81
5	Diskussion	88
5.1	Basisuntersuchungen – Histologie und Immunhistochemie	88

5.1.1	Aquaporin 1 und Zellmigration	88
5.2	Periostin	91
5.3	Ergebnisanalyse zum Knockdown von Aquaporin 1	92
5.3.1	Aquaporin 1 im Western Blot	93
5.3.2	Parameteranalyse	94
5.3.3	Kompensation des Knockdowns	94
5.3.4	Zellstress durch Nukleofektion	96
5.3.5	Analyse der Populationsvarianzen – Limitationen	97
5.4	Überexpression	99
5.4.1	Amplifizierung und Ligation	100
5.4.2	Transformation	101
5.5	Schlussfolgerungen	102
6	Zusammenfassung	104
7	Abkürzungsverzeichnis	107
8	Abbildungsverzeichnis	110
9	Tabellenverzeichnis	112
10	Literaturverzeichnis	113

11	Anhang	127
11.1	Eigenständigkeitserklärung	127
11.2	Danksagung	128
11.3	Lebenslauf	129

1 Einleitung

1.1 Osteoarthritis

Die Osteoarthritis ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit (Woolf & Pfleger, 2003; WHO, 2003). In Deutschland sind nahezu 50 % aller Frauen und knapp 30 % aller Männer nach dem 65. Lebensjahr von der Erkrankung betroffen (Robert Koch-Institut (Hrsg)). Die am häufigsten befallenen Gelenke sind Hand, Knie- und Hüftgelenke sowie die Wirbelsäule (Goldring & Goldring, 2007). Grundsätzlich kann die Erkrankung an jedem Gelenk auftreten (Hunter & Felson, 2006).

Die Osteoarthritis zeigt eine multifaktorielle Pathogenese. Die häufigsten bekannten Risikofaktoren, die zur Krankheitsentstehung führen sind: zunehmendes Lebensalter, weibliches Geschlecht, erlittene Gelenktraumata, Übergewicht, genetische Prädisposition und mechanische Einflüsse, wie z. B. Gelenkfehlstellungen (Loeser et al., 2012a). Es entstehen charakteristische Veränderungen am Gelenk wie fortschreitender Knorpelverlust, subchondrale Knochenveränderungen (Sklerosierung, Zystenbildung) und Osteophytenbildung. Darüber hinaus zeigt sich eine unterschiedlich stark ausgeprägte Entzündung der Gelenkinnenhaut, des Synoviums (Hunter, 2011). In den pathologischen Prozess der Krankheitsentwicklung sind alle Gelenkstrukturen mit einbezogen (**Abb. 1**). Die pathologischen Veränderungen bedingen die Entstehung von Schmerzen und können zu Gelenkdeformität bis hin zum Funktionsverlust des betroffenen Gelenkes führen (Loeser et al., 2012a).

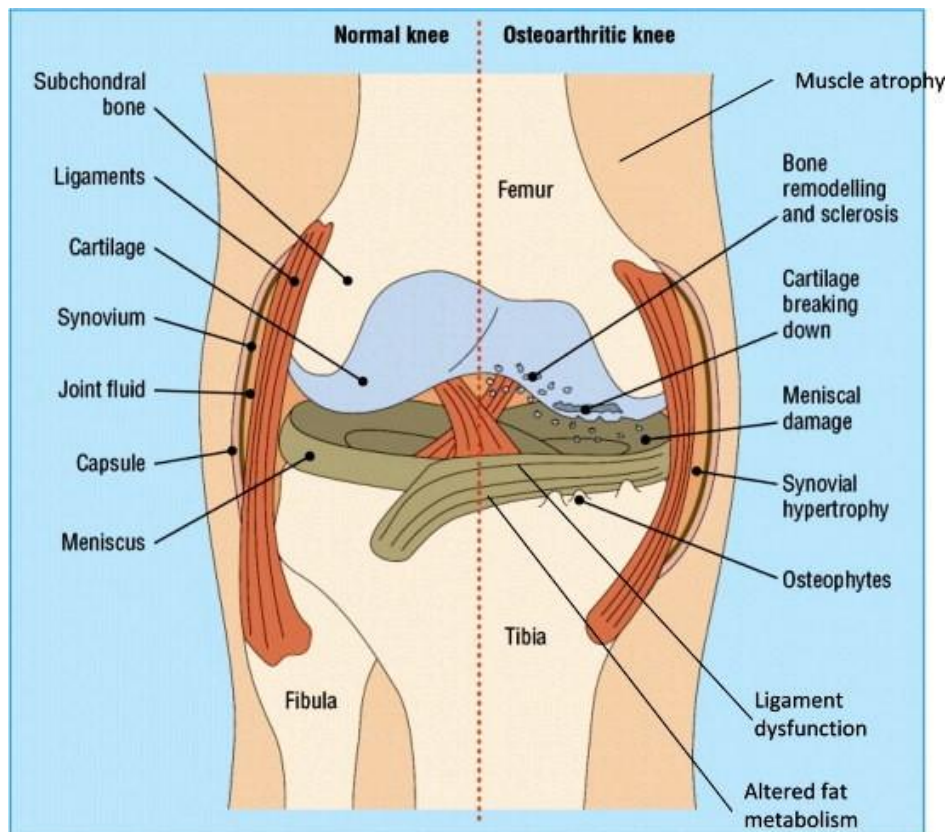


Abb. 1: Das Organsystem Gelenk: Schema eines Kniegelenkes mit Darstellung der bei Osteoarthrose beeinträchtigten Gewebe. Entsprechend der Theorie, dass Osteoarthrose eine Erkrankung des gesamten Gelenkes ist (Hunter, 2011).

Die Stützpfeiler der derzeitigen medizinischen Behandlungsmöglichkeiten (**Abb. 2**) umfassen konservative Maßnahmen wie physikalische Therapie, Patientenschulung, Gewichtsreduktion und ein ausreichendes Maß an körperlicher Aktivität. Die medikamentöse Therapie dient vor allem dem Schmerzmanagement, der Erhaltung der Funktionalität der betroffenen Gelenke und der Mobilität des Patienten (Hunter & Felson, 2006). Medikamente, die den Krankheitsverlauf positiv modifizieren, stehen kaum zur Verfügung bzw. sind in ihrer Wirkung umstritten. So steht häufig am Ende der Behandlungskette auch heute noch die chirurgische Intervention, vorrangig der künstliche Gelenkersatz. Alternative Methoden, die der Gelenkflächenwiederherstellung dienen, wie z. B. verschiedene Verfahren der autologen Zell- und Gewebetransplantationen sowie Versuche mit Hilfe von Spenderzellen das schadhafte Gewebe in vitro zu rekonstruieren (Tissue-Engineering), um es anschließend zu (re-)implantieren, sind derzeit noch einigen Limitationen unterworfen bzw. befinden sich in der Erforschung und Erprobung.

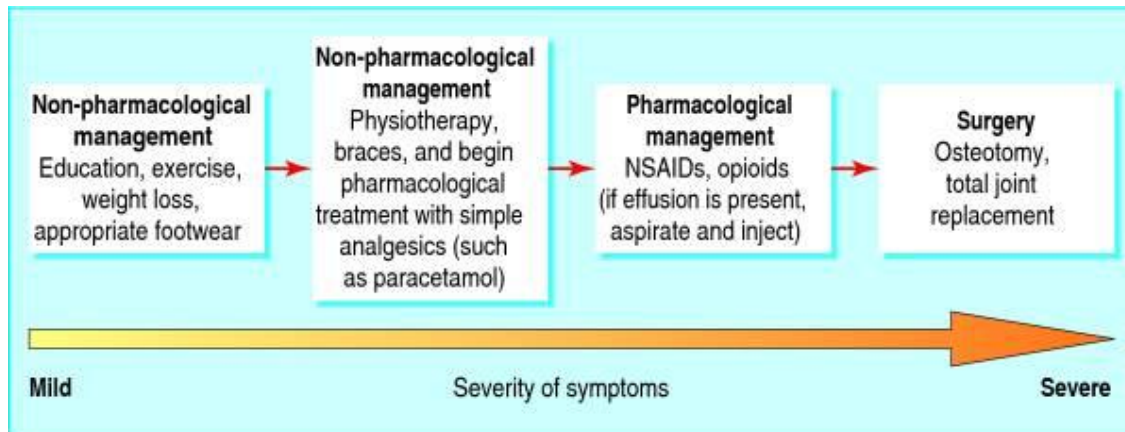


Abb. 2: Beispiel für einen Behandlungsalgorithmus im Management von Patienten mit Osteoarthritis. Modifiziert gemäß den Rückmeldungen von Patienten und den Präferenzen klinisch tätiger Ärzte: Hervorgehoben ist der Einsatz nicht-pharmakologischer Behandlungsmöglichkeiten an erster Stelle in der Therapie (Hunter & Felson, 2006).

Das statistische Bundesamt hat die Ausgaben für Arthroseerkrankungen im Jahr 2008 auf 7,62 Milliarden Euro beziffert. Zunehmendes Lebensalter und Adipositas gelten als starke Risikofaktoren für die Entwicklung der Osteoarthritis (Robert Koch-Institut (Hrsg)). Vor dem Hintergrund der derzeitigen demografischen Entwicklung sowie der steigenden Prävalenz der Adipositas stellt der Umgang mit der Erkrankung und ihren Folgen eine gesamtgesellschaftliche Herausforderung dar. Neben der Prävention gewinnt somit ein verbessertes Verständnis der Pathogenese an Bedeutung, insbesondere durch Erforschung der Krankheitsprozesse auf molekularbiologischer Ebene.

1.2 Aufbau des hyalinen Gelenknorpels

Der hyaline Knorpel leitet sich aus dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) ab und ist die häufigste Knorpelart im menschlichen Körper (Schiebler et al., 1984). Das hyaline Knorpelgewebe von Gelenken besteht mit 60-80 % zum größten Teil aus Wasser (Dijkgraaf et al., 1995). Die einzige zelluläre Einheit im Knorpelgewebe bilden die von extrazellulärer Matrix (EZM) umgebenen Chondrozyten.

Die Besonderheiten des Knorpelgewebes sind Druckelastizität und die Fähigkeit, Gewicht zu tragen. Gesunder, glatter hyaliner Gelenkknorpel überzieht die knöchernen Enden von Diarthrosen und ermöglicht ein möglichst reibungsarmes Gleiten der artikulierenden Skelettteile gegeneinander. Der Knorpel enthält keine Nervenfasern, keine Blut- oder Lymphgefäße (Schiebler et al., 1984). Die Schmerzwahrnehmung in Gelenken erfolgt über Nervenfaserendigungen in der Synovialmembran, der Gelenkkapsel, den Muskeln und dem subchondralen Knochen. Die Ernährung des bradytrophen Knorpelgewebes wird durch Diffusion von Nährstoffen aus der Synovialmembran und dem subchondralen Knochen gewährleistet. Die Stoffwechselprodukte werden ebenfalls durch Diffusion entfernt (Dijkgraaf et al., 1995). Die Diffusionsvorgänge werden durch physiologische Knorpelkompression, also durch Bewegung unterstützt (O'Hara et al., 1990). Demzufolge führt die Immobilisierung eines Gelenkes zu einer verschlechterten Versorgungssituation des Knorpelgewebes mit entsprechenden Auswirkungen auf das gesamte Gelenk als Organsystem (Dijkgraaf et al., 1995).

1.2.1 Chondrozyten

Der zelluläre Anteil am Knorpelvolumen beträgt nur etwa 2-3 % (Stockwell, 1967). Die funktionelle Einheit des Knorpels ist das Chondron. Es besteht aus einem oder mehreren Chondrozyten, die von einem gemeinsamen perizellulären Saum aus EZM umgeben sind. Die Organisation der Chondrozyten in Chondronen trägt zur Elastizität des Gewebes bei und dient dem Schutz der Zellen vor mechanischer Belastung (Tackmann & Tackmann, 2006). An die perizelluläre Matrix der Chondrone schließt sich die zellassozierte territoriale Matrix an. Der Raum zwischen den territorialen Matrices wird als interterritoriale Matrix bezeichnet. Die EZM wird von den Chondrozyten selbst synthetisiert. Die Zellen besitzen die für die Matrixsynthese nötigen Zellorganellen, wie endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat, und zeigen eine erstaunlich hohe metabolische Aktivität. Aufgrund der geringen Zelldichte im Knorpel gilt das Gewebe dennoch als bradytroph (Buckwalter & Mankin, 1998). Die von den Chondrozyten synthetisierte EZM ist rigide, so dass die Zellen im adulten Knorpel als ortsgebunden angesehen werden. Mit Erreichen der Skelettreife stellen die Chondrozyten auch ihre mitotische Aktivität nahezu vollständig ein (Söder & Aigner, 2011).

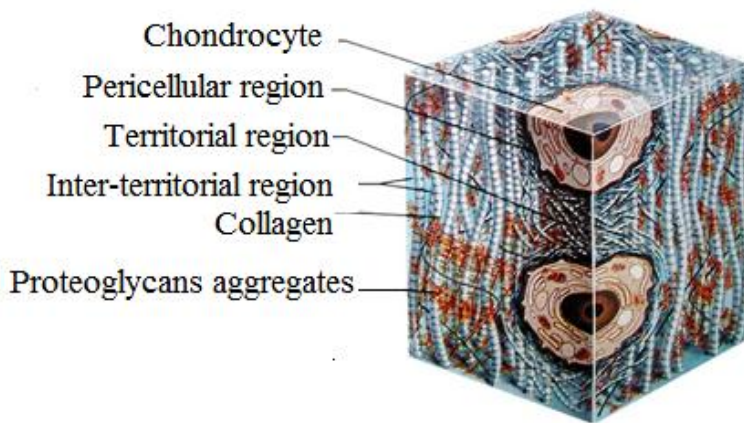


Abb. 3: Darstellung eines Gelenkknorpelfragmentes (Buckwalter & Martin, 1995).

Einige Chondrozyten verfügen über Zilien, die in die EZM hineinragen und als mechanisch-chemische Sensoren dienen (Muhammad et al., 2012). Einen direkten Zellkontakt zwischen den Chondrozyten gibt es im adulten Knorpel nicht. Die Kommunikation zwischen Zellen findet über die EZM statt (Kuettner, 1992).

1.2.2 Zusammensetzung der EZM

Die EZM setzt sich aus Kollagenen, Proteoglykanen und nichtkollagenen Glykoproteinen zusammen. Den quantitativ größten Anteil an Proteinen stellen Kollagene und Proteoglykane. Die Kollagene bilden ein Netzwerk, welches für die Zugfestigkeit der Knorpelmatrix verantwortlich ist. Die Proteoglykane (hauptsächlich Aggrekan) sind für die osmotischen und elastischen Fähigkeiten des Knorpelgewebes von großer Bedeutung (Gentili & Cancedda, 2009).

Die Kollagene machen im Gelenkknorpel ca. 50 % des Trockengewichtes aus (Kuettner, 1992). Alle Kollagenmoleküle bestehen aus drei Polypeptidketten. Weiterhin charakteristisch für die Struktur aller Kollagene ist das Vorhandensein von stabförmigen Segmenten mit sog. tripelhelikaler Anordnung: Die Kollagensuperhelix entsteht aus drei linksgängigen helikalen Strängen, die sich rechtsgängig umeinander winden. Die tripelhelikalen Abschnitten unterscheiden sich z. B. in ihrer Länge und bedingen somit die verschiedenen biologischen Eigenschaften der Kollagene (Löffler et

al., 2003). Die Kollagenfamilie besteht aus über 20 Mitgliedern, die aufgrund ihrer Strukturmerkmale in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Myllyharju & Kivirikko, 2004). Die zur Gruppe der fibrillenbildenden Kollagene gehörenden Kollagentypen I, II und III stellen alleine schon 90 % aller bekannten Körperkollagene (Löffler, 2005). Im hyalinen Gelenkknorpel sind folgende Kollagengruppen von Bedeutung: fibrillenbildende, mikrofibrilläre, fibrillenassoziierte, hexagonale Netze bildende sowie transmembrane Kollagene (Gelse et al., 2003). Für den hyalinen Gelenkknorpel spezifisch sind die Kollagentypen II, VI, IX, X und XI (Buckwalter & Mankin, 1998). Im adulten Knorpel beträgt der Anteil des fibrillenbildenden Kollagens Typ II nahezu 90 %. Damit ist dieser Kollagentyp durch die arkadenartige Anordnung seiner Fasern maßgeblich für die Zugfestigkeit und Formgebung des Knorpelgewebes verantwortlich (Kuettner, 1992).

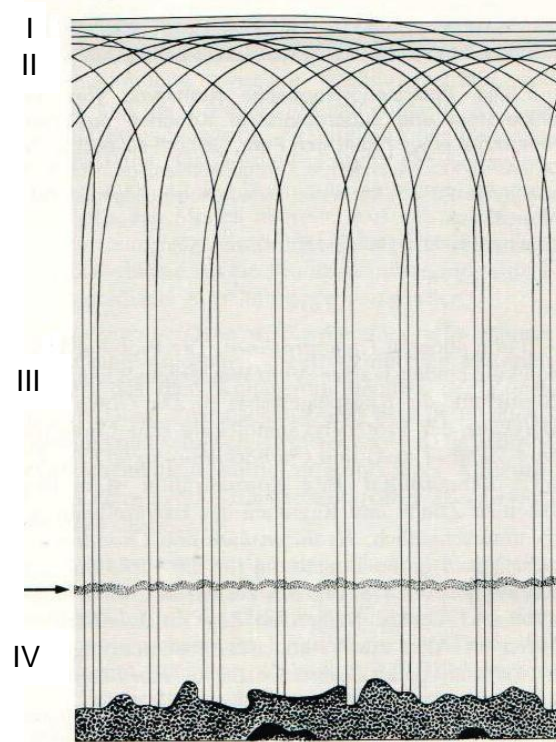


Abb. 4: Schematische Darstellung des Verlaufes der Kollagenfibrillen im Gelenkknorpel. Die Kollagenfibrillen ziehen vom subchondralen Knochengewebe (punktiert) senkrecht in die Zone des mineralisierten Knorpels (IV) und weiter in die Radiärzone (III), um dann im Bereich der Übergangszone (II) nach bogenförmigem Verlauf in die Tangentialfaserzone (I) einzumünden. Der Pfeil weist auf die Tidemark, der Grenzlinie zwischen nichtkalzifiziertem und kalzifiziertem Knorpel (früher: Grenzlinie nach Bennighoff) (Tillmann et al., 1987).

Kollagen Typ IX (fibrillenassoziiertes Kollagen) bindet kovalent an die Kollagen Typ II-Fibrillen und wirkt so als interfibrilläres Konnektormolekül (van der Rest, M & Mayne, 1988; Kuettner, 1992). Die Gerüstkonstruktion aus Kollagen Typ II und IX wird weiter durch die laterale Anlagerung von Kollagen Typ XI stabilisiert. Kollagen Typ XI (fibrillenbildendes Kollagen) kontrolliert zudem das diametrale Wachstum der Kollagenfasern (Blaschke et al., 2000). Die Vernetzung der Kollagene II, IX, XI bildet eine wichtige Grundlage für die besonderen Eigenschaften des Knorpelgewebes. Kollagen Typ VI (mikrofibrilläres Kollagen) spielt eine Rolle bei der Anheftung der Chondrozyten an die umgebende Matrix. Kollagen Typ X (hexagonale Netze bildendes Kollagen) findet sich in den kalzifizierenden Knorpelbereichen und wird während der fetalen Skelettentwicklung (enchondrale Ossifikation) von den hypertrophen Chondrozyten der hyalinen Knorpelmatrize gebildet (Buckwalter & Mankin, 1998)

Mutationen in den für die Kollagene codierenden Genen rufen Erkrankungen hervor, die unter anderem auch die Gelenkfunktionalität beeinflussen: Osteogenesis imperfecta, das Stickler-Syndrom (Kollagen Typ II u. XI), das Ehlers-Danlos-Syndrom (Kollagen Typ I-Defekt) und Chondrodysplasien (Kollagen Typ II-Defekt). Es sind auch genetisch bedingte Arthroseformen bekannt. So führen Mutationen im COL2A1-Gen z. B. zur primär generalisierten Osteoarthrose (PGOA) (Löffler et al., 2003; Söder & Aigner, 2011).

Den Raum zwischen den Kollagenfasern füllen die Proteoglykane aus. Sie machen 20-40 % des Trockengewichtes der EZM des Knorpels aus. Proteoglykane sind Makromoleküle die aus einem zentralen Protein (Core-Protein) bestehen, an welches viele Glykosaminoglykan-Ketten angeheftet sind. Glykosaminoglykane (GAGs) sind stark hydrophil und können große Wassermengen binden (Alberts et al., 2005). Das Proteoglykan Aggrekan nimmt eine zentrale Stellung im hyalinen Knorpel ein. Es ist über ein sogenanntes Link-Protein mit Hyaluronsäure (HS) verbunden. Zusammen bilden sie sehr große Aggregate. Diese Aggregate können hohe osmotische Drücke erzeugen und begründen die Fähigkeit des Knorpels anzuschwellen. Es kommt zur Ausbildung eines hydratisierten Gels (Löffler et al., 2003). Aus dem Zusammenspiel von Proteoglykanen, Hyaluronsäure und Kollagenfasern entsteht ein faserverstärktes Gel, eine viskoelastische Matrix, die starken Druckkräften widerstehen kann (Löffler et al., 2003; Alberts et al., 2005). Neben Aggrekan gibt es weitere Proteoglykane, wie Decorin, Biglykan und Fibromodulin. Sie gehören zur Gruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane, die die Kollagenfibrillenbildung regulieren. Membrangebundene Proteoglykane, z. B. Syndecane, fungieren als Co-Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (FGF, TGF- β) oder für die Zelladhäsion (Löffler et al., 2003). Andere Glykoproteine

wirken häufig als Verbindungsproteine (Linker-Proteine) und vermitteln die Anheftung der EZM-Komponenten untereinander (z. B. Fibronektin) oder an die Chondrozyten (z. B. die Matrilin). Das Glykoprotein COMP (cartilage oligomeric protein) greift in die Fibrillogenese ein und beeinflusst die Organisation der Kollagenfibrillen. Auf diese Weise leistet es einen essentiellen Beitrag zur Gewebeformierung und -funktion (Rosenberg et al., 1998; Halász et al., 2007).

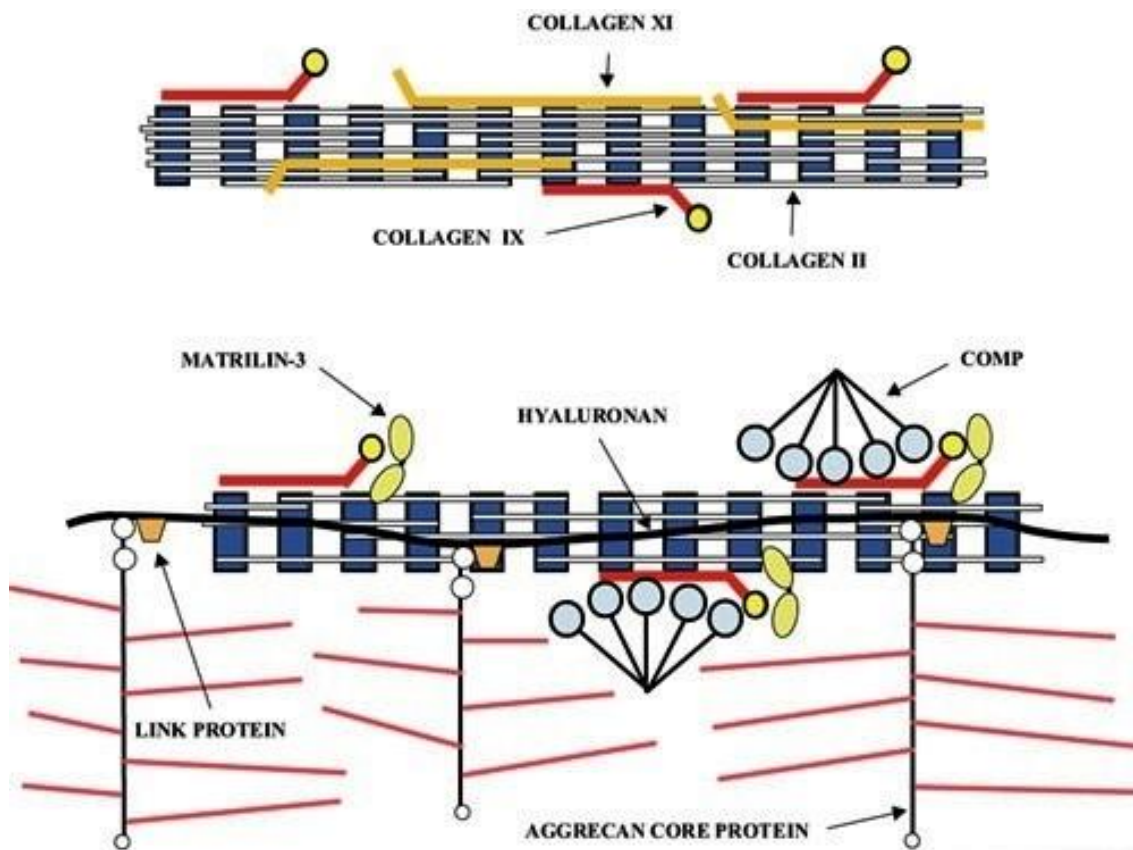


Abb. 5: Die Abbildung zeigt Kollagen-Komponenten (Kollagen Typ II, IX und XI) einer Knorpelfibrille (oben) und die Verbindung zwischen der Fibrille und den nichtkollagenen Komponenten des Knorpels, wie Matrilin-3, COMP und den Komplexen aus Aggrekan, Link-Protein und Hyaluronsäure (unten) (Reginato & Olsen, 2002).

1.2.3 Die Knorpelmatrix im dynamischen Gleichgewicht

Die Komponenten der EZM werden von den Chondrozyten synthetisiert und in den Extrazellarraum sezerniert. Die Chondrozyten übernehmen auch die Organisation der

Makromoleküle im Gewebe. Sie sorgen für ein Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -abbau unter physiologischen Bedingungen und erhalten so die Integrität des Gewebes (Aigner & Stöve, 2003). Diese fein aufeinander abgestimmten Prozesse funktionieren im Sinne einer positiven Rückkopplung zwischen dem extrazellulären Raum und den Chondrozyten (Buckwalter & Mankin, 1998). Hierzu erhalten die Zellen auf verschiedenen Wegen Signale über die Zusammensetzung der EZM, z. B. über mechanische Reize, gelöste Botenstoffe oder aber über die Interaktion mit den Matrixbestandteilen. Die Interaktion mit den Matrixbestandteilen wird über membranständige Rezeptoren vermittelt (Abramson & Attur, 2009). Die größte Rezeptorfamilie für Moleküle der EZM sind die Integrine. Nach erfolgter Rezeptor-Matrixadhäsion, z. B. mit Hilfe von Matrilinen, werden die Signale intrazellulär mit Unterstützung von Linker-Proteinen weiter gegeben. Daraufhin wird das Zytoskelett organisiert und verschiedene Signalwege aktiviert. Auf diese Weise hat die EZM Einfluss auf Zellfunktion, Zelladhäsion, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Zellmigration (Löffler et al., 2003).

Damit die Knorpelmatrix intakt bleibt, müssen sich anabole und katabole Prozesse die Waage halten. Die anabolen Prozesse werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie z. B. TGF- β (Transforming Growth Factor- β), VEGF (Vascular endothelial growth factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), BMP (Bone Morphogenetic Protein) sowie durch Wachstumshormone, wie beispielsweise Parathormon, stimuliert (Goldring, 2012). Sie fördern die de-novo Synthese der Matrixbestandteile. Die katabolen Prozesse werden hauptsächlich durch das Zytokin IL-1 β (Interleukin-1 β) und andere proinflammatorische Zytokine wie TNF- α (Tumornekrosefaktor α) gesteuert. Sie hemmen die anabolen und fördern die katabolen Prozesse, unter anderem die Synthese von proteolytischen Enzymen, die den Abbau der Matrixbestandteile bewirken (Kapoor et al., 2011). Zu diesen Enzymen gehören die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und die Aggrekanasen. Die MMPs arbeiten zinkabhängig und weisen eine hohe Substratspezifität auf. Die Sezernierung der meisten MMPs in den Extrazellulärraum erfolgt in einer inaktiven Form (Pro-Enzym). Die Enzyme werden extrazellulär durch proteolytische Spaltung aktiviert (Löffler et al., 2003). **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die knorpelspezifischen MMPs und ihre Substrate.

Tab. 1: Matrix-Metalloproteinasen der Knorpelmatrix und ihre Substrate. Modifizierte tabellarische Darstellung nach (Löffler et al., 2003; Spahn, 2006)

Enzym	Substrate
MMP-1	Kollagen Typ I, II, III, VII, X, Pro-MMP-2 u. 9
MMP-2	Kollagen Typ I, IV, V, X, Aggrekan, Link-Protein
MMP-3	Kollagene u. nichtkollagene EZM-Proteine, Pro-MMP-1, -8, -9, -13, Inaktivierung von Protease-Inhibitoren
MMP-7	EZM-Proteine, Pro-MMP-1, -2, u. -9
MMP-8	Kollagen Typ I, II, III, Aggrekan
MMP-9	Kollagen Typ IV, V, XI, Aggrekan, Link-Protein
MMP-10	s. MMP-3
MMP-12	Fibronektin
MMP-13	Kollagen Typ I, II, III, Aggrekan
MMP-14	Kollagen Typ I, II, III, Fibronektin, Proteoglykane

Die wichtigsten Aggrekanasen im Knorpelgewebe sind ADAMTS-4 und ADAMTS-5. Ihr proteolytisches Substrat ist Aggrekan (Wang et al., 2011). ADAMTS steht für a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. Die Aktivität von ADAMTS-4 und ADAMTS-5 sowie der MMPs wird durch die TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinase) gehemmt (Nagase & Kashiwagi, 2003).

1.2.4 Einblick in molekularbiologische Prozesse der Osteoarthroseentstehung

Bei Schädigung der Knorpelmatrix, infolge der unter 1.1 benannten Risikofaktoren, steigern die Chondrozyten ihren Stoffwechsel, um die Integrität der EZM aufrechtzuerhalten. In ihrem Kompensationsbemühen verändern sich die Chondrozyten phänotypisch. Sie proliferieren und lagern sich zu Zellkomplexen, sog.

Chondrozytenclustern, zusammen (Söder & Aigner, 2011). Die Reparaturfähigkeit der Chondrozyten ist jedoch begrenzt (Eyre, 2004). Überwiegen die katabolen Prozesse kommt es durch die proteolytischen Prozesse zum Matrixverlust (Kuettner, 1992). Durch den Matrixverlust werden die Kollagenfasern demaskiert (Fibrillisation) und mikroskopisch als sogenannte Asbestfasern sichtbar (Kühnel, 2002).

Die katabolen Prozesse, die den Matrixabbau bedingen, werden hauptsächlich durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α gesteuert. Diese Zytokine werden von Synovialzellen, Chondrozyten, Monozyten und Osteoblasten des betroffenen Gelenkes synthetisiert (Kapoor et al., 2011). TNF- α unterdrückt die Bildung von Proteoglykanen, Link-Protein und Kollagen Typ II in den Chondrozyten und stimuliert die Sezernierung der MMPs-1, -3 und -13 (Saklatvala, 1986; Lefebvre et al., 1990; Reboul et al., 1996). IL-1 β supprimiert die Bildung von Kollagen Typ II und Aggrecan und fördert die Sezernierung von MMP-1, -3, -9 und -13 (Lefebvre et al., 1990; Mohtai et al., 1993; Reboul et al., 1996; Stöve et al., 2000; Chadjichristos et al., 2003). TNF- α und IL-1 β induzieren die Produktion von IL-6 sowie weiterer katabol wirksamer Zytokine und Chemokine (Guerne et al., 1990). IL-6 arbeitet synergistisch mit IL-1 β hinsichtlich der Unterdrückung der Kollagen Typ II-Expression und der Synthese von MMPs (Rowan et al., 2001).

Die Kollagen Typ II-Synthese, ein möglicher Reparaturversuch der Chondrozyten, wird supprimiert, indem TNF- α und IL-1 β die Expression des Transkriptionsfaktors SOX9 hemmen (Murakami et al., 2000). SOX-Transkriptionsfaktoren sind während der fetalen Skelettentwicklung entscheidend für die Differenzierung der Chondrozyten aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Ikeda et al., 2005). SOX9 initiiert in diesem Entwicklungsprozess die Transkription von Kollagen Typ II durch Bindung an das codierende Gen COL2A1 (Bell et al., 1997; Lefebvre et al., 1997). SOX9 wird auch als „master gene“ der Chondrogenese bezeichnet, da es nicht nur für die Expression von Kollagen Typ II, sondern auch für die Expression der Kollagen Typen IX und XI sowie von Aggrecan und COMP von entscheidender Bedeutung ist (Murakami et al., 2000; Wong & Carter, 2003). Mutationen im SOX9-Gen führen z. B. zum Syndrom der kampomelen Dysplasie, einer Erkrankung, bei der es unter anderem zur Ausprägung diverser Skelettfehlbildungen und zu Störungen in der Entwicklung und Ausreifung der geschlechtsspezifischen Merkmale kommt (Foster et al., 1994). Die Expression von SOX9 ist nachweislich deutlich verringert in arthrotisch verändertem humanem Knorpelgewebe (Haag et al., 2008). Einerseits kommt es also durch den Einfluss der pro-inflammatorischen Zytokine zur Hemmung der Neusynthese knorpelspezifischer Kollagene, wie Kollagen Typ II, IX und XI. Andererseits fördern diese Zytokine die

Bildung knorpelunspezifischer Kollagene, wie Kollagen Typ I, III und V, welche als chondrozytäre Dedifferenzierungsmarker bekannt sind (Sandell & Aigner, 2001). Als weiterer Dedifferenzierungsmarker könnte das in der tiefen, kalzifizierenden Knorpelzone (Radialzone; orientierend siehe **Abb. 4**) exprimierte Kollagen Typ X geeignet sein. Kollagen Typ X ist als Marker für hypertrophe Knorpelzellen in der Embryonalentwicklung beschrieben worden (Reichenberger et al., 1991) und wird bei Osteoarthritis vermehrt gebildet (Reichenberger et al., 1991; Kuettner, 1992; Aigner et al., 1993; Girkontaite et al., 1996).

Den ausgeprägtesten Anteil am Matrixabbau hat MMP-13. Zum einen wird die Expression von MMP-13 durch IL-1 β und TNF- α stark hochreguliert, zum anderen ist das bevorzugte Substrat der Metalloproteinase Kollagen Typ II, das Hauptkollagen des Knorpelgewebes (Tetlow et al., 2001; Knäuper et al., 1996; Abramson & Attur, 2009).

ADAMTS-4 und ADAMTS-5 sind die bestimmenden Enzyme des Aggrekanabbaus (Wang et al., 2011). ADAMTS-5 ist sowohl im normalen als auch im degenerativ veränderten Knorpelgewebe aktiv (Bondeson et al., 2006). Interessanterweise scheinen ADAMTS-5-Knockout-Mäuse (jedoch nicht ADAMTS-4-Knockout-Mäuse) mit chirurgisch induzierter Gelenkinstabilität vor Knorpelerosionen geschützt zu sein (Glasson et al., 2004; Glasson et al., 2005). Auf die Aktivierung der Aggrekanase ADAMTS-5 haben die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α nachweislich keinen Einfluss, während die Synthese der Aggrekanase ADAMTS-4 durch die beiden Zytokine induziert wird (Bondeson et al., 2006).

Dem proteolytischen Abbau der EZM entgegensteuern können die TIMPs. Wieder sind es IL-1 β und TGF- α , die im Sinne der katabolen Prozesse modulierend wirken und die Synthese der TIMPs unterdrücken, so dass im Knorpelgewebe von OA-Patienten quantitativ und in ihrer Aktivität die MMPs überwiegen (Dean et al., 1989; Blanco Garcia, F J, 1999; Huang et al., 2011).

IL-1 β und TNF- α stimulieren die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren, wie z. B. Stickstoffmonoxid (NO). NO fördert die Aktivierung und Synthese von MMPs, inhibiert die Bildung von Makromolekülen der EZM und die Bildung von IL-1Ra als IL-1-Rezeptorantagonisten. NO spielt auch eine Rolle in der Apoptose von Chondrozyten und induziert die Synthese der katabolen Entzündungsmediatoren Cyclooxygenase 2 (COX-2) und Prostaglandin E₂ (Martel-Pelletier et al., 2008). Die Aktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) durch die Zytokine IL-1 β und TNF- α trägt ebenfalls zur Schädigung des Knorpelgewebes bei.

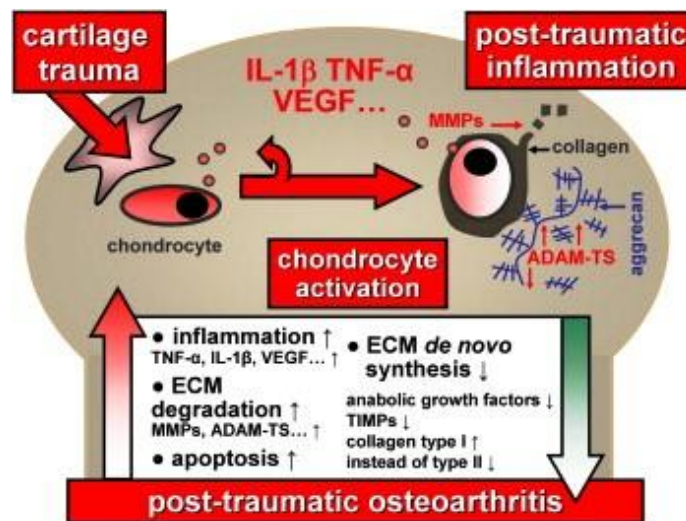


Abb. 6: Chondrozytenaktivierung infolge einer traumatischen Knorpelverletzung. Ein Knorpeltrauma induziert chondrozytären und synovialen Stress, welcher zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Mediatoren wie IL-1 β , TNF- α und VEGF führt. Diese Zytokine induzieren katabole Reaktionen im Knorpel, wie Inhibierung der Synthese Knorpel spezifischer EZM, Hochregulierung von nicht spezifischen EZM-Komponenten wie Kollagen Typ I, Induktion von inflammatorischen Downstream-Mediatoren und kataboler Enzyme wie MMPs und Aggrekanasen sowie eine ansteigende chondrozytäre Apoptoserate (Schulze-Tanzil, 2009).

Ein wichtiger Gegenspieler von IL-1 in gesundem Knorpel ist der Wachstumsfaktor TGF- β . TGF- β fördert die Produktion von Kollagen Typ II, Aggrecan und TIMPs und hemmt die Tätigkeit der MMPs und die Synthese von Aggrekanasen. Der Wachstumsfaktor ist zudem in der Lage, die Transkription des IL-1 Rezeptors und die Bindungsaktivität des Zytokins an seinen Rezeptor zu inhibieren (Redini et al., 1988; Rédini et al., 1993). Darüberhinaus kann TGF- β die Synthese des IL-1 Rezeptorantagonisten IL-1Ra induzieren. Dieses Wechselspiel zwischen Zytokin und Wachstumsfaktor dient der Knorpelhomöostase (Pujol et al., 2008). Bei der Erkrankung Osteoarthritis verlieren die Chondrozyten zunehmend die Fähigkeit den TGF- β Typ II Rezeptor zu exprimieren und werden gegenüber dem Wachstumsfaktor unempfindlich. Dieser Expressions- und Wirkungsverlust ist wiederum IL-1 β zu verdanken (Baugé et al., 2007).

1.2.5 Periostin

Ein ähnliches Wechselspiel zwischen TGF- β und IL-1 β scheint es bezüglich des EZM-Proteins Periostin zu geben. Periostin ist ein 90 kDa großes Protein, welches ursprünglich als ein durch TGF- β induzierbarer Osteoblasten stimulierender Faktor entdeckt wurde. Periostin galt dementsprechend als von Osteoblasten sezerniertes Protein, wichtig für Zellmigration und -adhäsion in der Skelettentwicklung (Horiuchi et al., 1999). Periostin wurde später ebenfalls in Chondrozyten und im Knorpelgewebe während der fetalen Skelettentwicklung nachgewiesen (Blumer, Michael J F et al., 2006; Emans et al., 2007; Zhu et al., 2008). Aufgrund seiner Expression in kollagenreichem Bindegewebe wurde vermutet, dass Periostin eine Rolle in der Kollagenfibrillogenese spielt (Borg & Markwald, 2007). Tatsächlich konnte dies bezüglich Kollagen Typ I bestätigt werden. Periostin kann die Kollagen Typ I Fibrillogenese über eine direkte Interaktion mit dem Kollagen regulieren und so z. B. im Rahmen der Wundheilung zur Restitution des Gewebes beitragen (Norris et al., 2007; Hamilton, 2008). Darüber hinaus wird Periostin unter einigen pathologischen Bedingungen exprimiert. Hierzu gehören kardiovaskuläre Erkrankungen (z. B. Herzinfarkt), onkologischen Erkrankungen (z. B. Prostatakarzinom), fibrotische Prozesse (z. B. bei Asthma bronchiale) aber auch die Frakturheilung (Nakazawa et al., 2004; Hamilton, 2008; Rani et al., 2009). Neuere Forschungsergebnisse legen nahe, dass Periostin zudem eine Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von Periostin im Knorpelgewebe von Patienten mit fortgeschrittener Osteoarthritis deutlich erhöht war, im Vergleich zur nicht erkrankten Kontrollgruppe (Karlsson et al., 2010; Attur et al., 2011). Desweiteren konnte in isolierten Chondrozyten aus erkranktem Gewebe die Transkription von Periostin mittels TGF- β signifikant stimuliert und durch Zugabe der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α gehemmt werden. Die gleiche Forschungsgruppe vermutete auf der Grundlage von Experimenten mit mesenchymalen Stammzellen, dass Periostin durch Induktion von MMP-13 am Matrixabbau beteiligt sein könnte (Attur et al., 2011). Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Periostin und der Induktion von MMPs wurde bereits im Zusammenhang mit kardio-valvulären Erkrankungen geschildert (Hakuno et al., 2010). Die Studie von Rousseau et. al beschreibt eine gegenläufige Entwicklung von Periostin im Serum und der Krankheitsprogression von Osteoarthritis bei postmenopausalen Frauen. Die Ergebnisse der Follow-up Studie wurden dahingehend interpretiert, dass ein Anstieg

des Serum-Periostins mit einer geringeren Krankheitsprogression einhergeht (Rousseau et al., 2013).

Die Klärung der Funktion von Periostin für die Erkrankung Osteoarthritis bedarf weiterer Untersuchungen. Dies gilt ebenso für das Rollenverständnis des Wasserkanals Aquaporin 1 in der Pathogenese der Osteoarthritis.

1.3 Aquaporin 1

Aquaporin 1 (AQP1) war der erste entdeckte und in seiner Funktion identifizierte Wasserkanal (Denker et al., 1988; Preston et al., 1992). Seit seiner Erstbeschreibung in humanen Erythrozyten konnten über 200 weitere Aquaporine in Pflanzen, Bakterien, Tieren und Menschen identifiziert werden (Agre et al., 2002). AQP1 ist bis dato einer von 13 bekannten humanen Aquaporinen (Verkman, 2011).

1.3.1 Struktur

Die humanen Aquaporine bilden eine Gruppe kleiner Transmembranproteine (ca. 30 kDa/Monomer), deren Monomere sich in Zellmembranen zu Tetrameren zusammenlagern (Verbavatz et al., 1993). Sie werden in primär wasser-selektive Kanäle (AQP1-5 und 8) und in Aquaglyceroproteine (AQP3, 7 und 9) eingeteilt. Aquaglyceroproteine sind in der Lage neben Wasser Glycerol sowie andere kleine Moleküle zu transportieren (Agre et al., 2002). Die Lokalisationen und Funktionen von AQP10-13 sind noch ungeklärt (Verkman, 2011).

Ein AQP1-Monomer besteht aus 269 Aminosäuren und kann als nicht-glykosylierte Variante (28 kDa) oder als deren glykolysierte Isoform (35-60 kDa) vorliegen (Denker et al., 1988; Preston and Agre, 1991). Ein Monomer enthält sechs α -helicale Domänen, welche die Membran durchspannen und über fünf Schleifen (Loops, A-E) miteinander verbunden sind (Jung et al., 1994). In den Schleifen B und C befinden sich zwei charakteristische sequenzhomologe Struktur motive (Wistow et al., 1991). Hierbei handelt es sich um hochkonservierte Aminosäuresequenzen (englisch: NPA motifs),

die sich aus den drei Aminosäuren Asparagin, Prolin und Alanin zusammensetzen. Vermutungen, dass diese Sequenzhomologe für die Formgebung der Aquaporin-Monomere in Gestalt einer Sanduhr verantwortlich sind und so jedes Monomer einen zentralen porenartigen Wasserkanal bildet, wurden durch elektronenkristallografische und elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (Jung et al., 1994; Cheng et al., 1997; Walz et al., 1997). Die ersten dreidimensionalen Atommodelle zur Aquaporinstruktur verdeutlichten, dass diese besonderen Aminosäuresequenzen neben der Formgebung auch die Stabilität und Wasserselektivität der Kanäle bedingen (Ren et al., 2000; Murata et al., 2000; Ren et al., 2001).

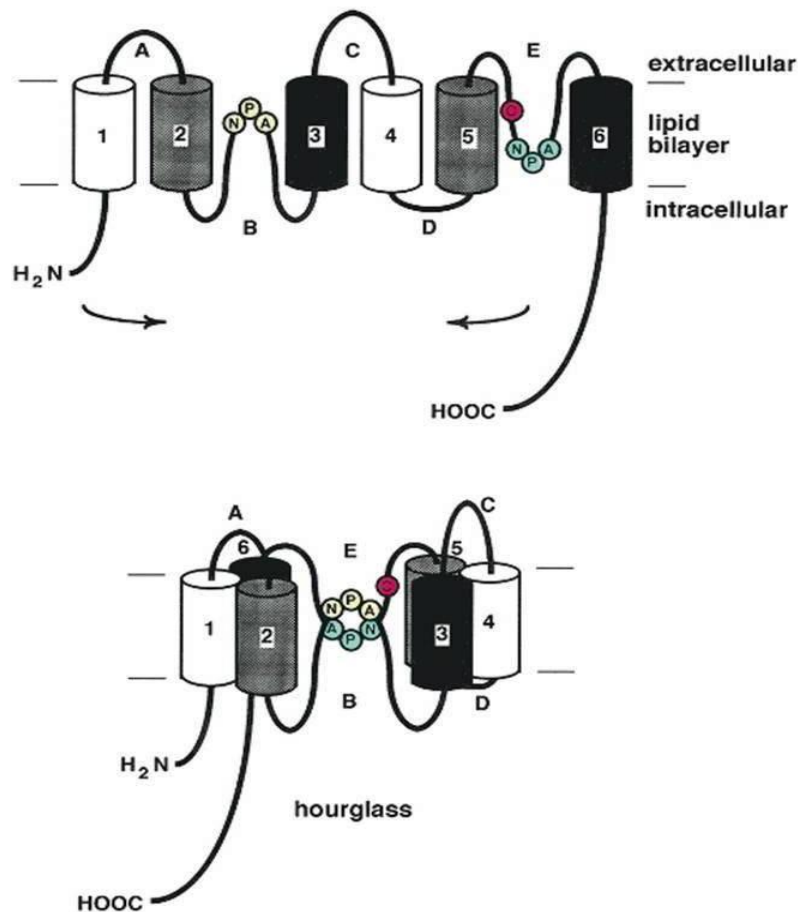


Abb. 7: Sanduhr-Modell von Aquaporin 1. Die Anordnung der Schleifen B und E mit den hochkonservierten NPA motifs formen einen Weg für Wasser durch eine Aquaporin-Untereinheit (Jung et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass die zentrale Wasserpore an ihrer engsten Stelle einen Durchmesser von nur 0,3 Nanometern aufweist und durch den Aufbau eines

elektrische Feldes für neutrale Wassermoleküle, nicht aber für Protonen passierbar ist (Murata et al., 2000). Bis zu drei Milliarden Wassermoleküle (ein Molekül nach dem anderen) können so pro Monomer und pro Sekunde, angetrieben durch osmotische Gradienten über den Zellmembranen, transportiert werden (Zeidel et al., 1992). Ein Monomer bildet dabei einen in beide Richtungen arbeitenden Wasserkanal. Jeder Wasserkanal agiert autonom, unabhängig von seiner Einbettung in eine tetramerische Gesamtstruktur (Verkman & Mitra, 2000).

Dass AQP1 nicht nur für Wasser sondern auch für Gase, wie z.B. CO_2 oder für Kationen durchlässig sein soll, ist immer wieder Gegenstand verschiedener wissenschaftlicher Arbeiten (Cooper & Boron, 1998; Anthony et al., 2000). Da diesbezüglich eine abschließende Einschätzung fehlt, erfolgte die Erwähnung dieser Forschungsansätze der Vollständigkeit halber.

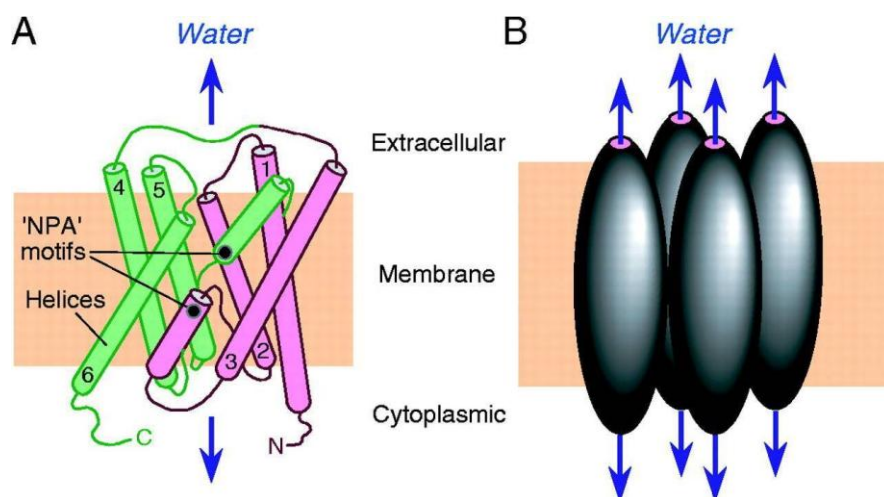


Abb. 8: Struktur der Aquaporin-Monomere und tetramerische Anordnung in Zellmembranen. (A) Kristalline Struktur eines Aquaporin-Monomers mit den geeigneten α -helicalen Domänen (bezeichnet mit 1-6), die die Wasserpore umgeben. Die konservierten NPA motifs sind angedeutet. (B) Die tetramerische Anordnung von Aquaporin 1 in der Membran, so dass jedes Monomer eine Wasserpore enthält (Verkman, 2005).

1.3.2 Lokalisation

AQP1 wird in den Plasmamembranen von Epithel- und Endothelzellen von Menschen und Säugetieren exprimiert. Mittels Microarray-Analytik (TMA, tissue microarray analysis) wurde AQP1 in 60 von 66 untersuchten, nicht pathologisch veränderten, humanen Geweben in unterschiedlich starker Ausprägung identifiziert (Mobasheri & Marples, 2004). Am häufigsten konnte AQP1 beispielsweise im Plexus choroideus und im Nierengewebe nachgewiesen werden. Eine vergleichsweise moderate Expressionshäufigkeit zeigte sich im Lungengewebe, in der Harnblase sowie im hyalinen Gelenkknorpel. Im Fettgewebe der Brust und einigen ovariellen Strukturen konnte hingegen kein AQP1 detektiert werden.

1.3.3 Funktionen

Aquaporine dienen der osmotischen Regulation, indem sie Wasserfluss durch Zellmembranen entlang eines osmotischen Gradienten ermöglichen, aber gleichzeitig einen Konzentrationsausgleich durch Ionen- und Protonenströme verhindern. Das existentielle Membranpotential kann so aufrecht erhalten werden (de Groot et al., 2003).

Aufgrund seiner Wassertransport-Funktion ist AQP1 in viele physiologische Prozesse, wie der epithelialen Flüssigkeitssekretion (z.B. glandulär, ciliär, cerebellär etc.) oder der Urinkonzentrierung in den Nieren, involviert (Verkman, 2008). Untersuchungen an AQP1-Knockout-Mäusen zeigten, dass die Blockade des Gens bei den Tieren unter anderem zu einer polyurischen Symptomatik, aber auch zur Kataraktentstehung führen konnte (Ma et al., 1998; Ruiz-Ederra & Verkman, 2006). Eine seltene, beim Menschen bekannte Aquaporinopathie beruht auf der chromosomalen Nachbarschaft des AQP1-Gens mit dem Colton Blutgruppen-Antigen. Die Betroffenen, denen das Colton Blutgruppenantigen homozygot fehlte, wiesen Mutationen im AQP1-Gen auf, mit der Folge, dass AQP1-Proteine gar nicht oder in nur stark verminderter Anzahl synthetisiert wurden. Die Patienten waren bezüglich ihrer Nierenfunktion phänotypisch unauffällig. Wurde ihnen aber Wasser vorenthalten, entwickelten sie eine manifeste Urinkonzentrierungsstörung (King et al., 2001).

Dass AQP1 ebenfalls eine Rolle in der Zellmigration spielt, wurde im Zusammenhang mit Untersuchungen an AQP1-Knockout-Mäusen bekannt. Bei den Mäusen wurde ein deutlich verzögertes Tumorwachstum mit einer verringerten Tumolvaskularisation festgestellt. Anschließend Versuche mit murinen aortalen Endothelzellen zeigten, dass AQP1 deren Migration förderte und somit auch die Angiogenese. Die Forschungsgruppe konnte darüberhinaus an nicht-endothelialen, mit AQP1 transfizierten Zellen (die natürlicherweise nicht über AQP1-Wasserkanäle verfügen) demonstrieren, dass AQP1 und AQP4 deren Migrationsverhalten stimulieren. Basierend auf diesen Erkenntnissen postulierten die Forscher, dass Aquaporine eine wichtige Rolle in der Zellmigration und somit auch in der Angiogenese, der Wundheilung, der Tumorausbreitung und Organregeneration spielen (Saadoun et al., 2005).

Für verschiedene Aquaporine konnte eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens unterschiedlicher Zelltypen nachgewiesen werden (Schwab et al., 2012). Bezüglich AQP1 gelang dieser Nachweis ebenfalls an murinen Chondrozyten (Liang et al., 2008). Über welche Mechanismen Aquaporine die Zellbewegung beeinflussen ist Gegenstand verschiedener Modelle und noch nicht eindeutig geklärt (Loitto et al., 2009; Papadopoulos et al., 2008). Voraussetzung für die Migration von Zellen sind transiente Membranausstülpungen, wie z. B. die Ausbildung von Lamellipodien (Zellfortsätzen) (Alberts et al., 2005). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Aquaporine verstärkt im Leitsaum (leading edge) von Lamellipodien migrierender Zellen auftreten und es in dieser Zellregion zu einem verstärkten Wassereinstrom kommt (Saadoun et al., 2005; Huebert et al., 2010). Die Lamellipodienbildung geht mit einer veränderten Organisation des Zytoskeletts, vornehmlich der Aktinfilamente, einher (Alberts et al., 2005). Für die Organisation des Zytoskeletts sind Gerüstproteine in der Plasmamembran verantwortlich, die eine oder mehrere Proteininteraktionsdomänen (sog. PDZ-Domänen) enthalten. Neben der Organisation des Zytoskeletts sind Gerüstproteine an einer Vielzahl von lebensnotwendigen zellulären Prozessen beteiligt. Sie können z. B. Zell-Zell-Kontakte vermitteln, Rezeptoren, Ionenkanäle und Signalmoleküle akquirieren und sind essentiell zur Schaffung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität (Pawson & Nash, 2003; Feng et al., 2005; Funke et al., 2005). Ein bekanntes Gerüstprotein epithelialer und neuronaler Zellen ist ein heterotrimerer Komplex, der die PDZ-Domänen Lin-2 (auch CSAK), Lin-7 und Lin-10 enthält (Butz et al., 1998; Kaech et al., 1998). Eine mit humanen Melanom- und Endothelzellen durchgeführte Studie konnte zeigen, dass AQP1 über die Interaktion mit der PDZ-Domäne Lin-7 und im Folgenden über das Verbindungsprotein β -Catenin die

Zytoskelettorganisation beeinflusst. Die Zellen, in denen die AQP1-Expression unterdrückt wurde, verloren die Fähigkeit ihr Zytoskelett zu organisieren und somit auch die Fähigkeit zu migrieren (Monzani et al., 2009). Die PDZ-Domäne Lin-2 verfügt via spezifischer Verbindungsproteine ebenfalls über die Fähigkeit mit dem Zytoskelett zu interagieren (Cohen et al., 1998). Darüberhinaus konnten die Autoren zeigen, dass Lin-2 an einen Syndecan-Rezeptor in der Plasmamembran bindet. Syndecane sind Proteoglykane, die wie bereits unter 1.2.2 erwähnt als extrazelluläre Matrix-Rezeptoren fungieren.

Eine weitere Funktion scheint AQP1 im Bereich der Schmerzwahrnehmung zu haben, wie Untersuchungen an dorsalen Spinalganglien implizieren (Zhang & Verkman, 2010).

1.3.4 Aquaporin 1 und Osteoarthritis

Das Vorhandensein sowie das Expressionsmuster von AQP1 (vorwiegend Radialzone; orientierend siehe **Abb. 4**) im pathologisch nicht veränderten humanen hyalinen Gelenkknorpel wurde, wie von Mobasher und Marples 2004 beschrieben, durch eine weitere methodisch ähnliche Studie (TMA, Immunhistochemie) bestätigt (Trujillo et al., 2004). Die Verfasser dieser Studie verglichen darüber hinaus die Gewebeproben aus dem sog. normalen hyalinen Knorpel (n=3), mit Gewebeproben von Patienten mit Osteoarthritis (n=3) und Rheumatoider Arthritis (RA, n=3). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von AQP1 zwischen normalem und arthrotischen Knorpelgewebe festgestellt werden. Allerdings wurde in der Immunfluoreszenz eine chondrozytäre Hochregulation von AQP1 in den Gewebeproben der RA-Patienten sichtbar.

Bei Ratten wurde die Genexpression von AQP1 und AQP3 nach experimentell induzierter Osteoarthritis des Kiefergelenkes gemessen (Meng et al., 2007). Die Ergebnisse der quantitativen Real-time PCR besagten, dass die mRNA von AQP3 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne experimentell induzierte Osteoarthritis stark hochreguliert war, die mRNA von AQP1 jedoch nicht.

Dass AQP1 eine Rolle in der Osteoarthritis spielt, legt eine 2009 veröffentlichte Studie nahe, in der mit humanem Knorpelgewebe von Patienten mit gesicherter Osteoarthritis gearbeitet wurde. Die Gewebegewinnung erfolgte im Zuge der endoprothetischen Kniegelenksversorgung. Das intraoperativ entnommene Gewebe

wurde makroskopisch in intakte und geschädigte Areale eingeteilt. Die aus beiden Arealen isolierte RNA wurde nach ihrer Umschreibung in cDNA auf Genchips (Affymetrix, Microarray-Analyse) aufgetragen und die Genexpression verglichen. Die Genchipanalyse zeigte 411 differentiell regulierte Gene. Nach Validierung der Ergebnisse mittels quantitativer Real-time PCR (qRT-PCR) waren insgesamt sechs Gene in den geschädigten Knorpelarealen aller Patienten (n=5) hochreguliert. Dabei handelte es sich neben AQP1 um IGFBP-3 (Insuline-like growth factor binding protein 3), WISP-1 (Wnt-induced signaling protein 1), DAF (Decay accelerating factor, CD55), CFI (Complement factor I) und DNER (Delta/Notch like EGF-related receptor). Parallel angefertigte immunhistologische Gewebepräparate zeigten eine verstärkte Expression von AQP1 in den oberflächlichen Bereichen (Tangentialzone; orientierend siehe **Abb. 4**) der geschädigten Knorpelareale (Geyer et al., 2009). Die erhobenen Befunde wurden auf immunhistologischer Ebene untermauert (Hagiwara et al., 2013). Eine weitere Microarray-Analyse in welcher die Genexpression von Patienten mit Osteoarthritis des Kniegelenkes mit dem Expressionsprofil von gesunden Gewebespendern verglichen wurde, konnte eine 39,8 fache Hochregulation von AQP1 in dem pathologisch veränderten Gewebe nachweisen (Karlsson et al., 2010).

1.4 Fragestellung der Dissertationsarbeit

Die Osteoarthritis ist die häufigste Gelenkerkrankung des Menschen. Sie geht mit erheblichen Einbußen bezüglich der Lebensqualität für den einzelnen Betroffenen und enormen sozioökonomischen Auswirkungen für die Gesellschaft einher. Die Erkrankung ist Folge eines multifaktoriellen Geschehens und erfasst das gesamte Organsystem Gelenk. Es kommt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Synovialzellen, Makrophagen und Chondrozyten. Eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Osteoarthritis nehmen die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α ein. Sie wirken hemmend auf anabole Prozesse und führen so zu einer sinkenden Synthese knorpelspezifischer Matrixproteine wie Kollagen Typ II, IX und Aggrecan. Gleichzeitig kommt es zur verstärkten Bildung knorpelunspezifischer Kollagene (Kollagen Typ I, III und V). Zudem werden katabole Vorgänge gefördert, indem die Synthese und Sekretion matrixabbauender Enzyme (MMP-1, -2, -8, -9, -13 und ADAMTS-4, -5) sowie weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren (COX-2)

induziert wird. Letztendlich kommt es zur Störung des sensiblen Gleichgewichtes zwischen Matrixsynthese und –abbau zugunsten der katabolen Prozesse.

Da Genexpressionsanalysen darauf hindeuteten, dass der Wasserkanal AQP1 eine Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielen könnte war es Ziel dieser Arbeit, molekulare zellbiologische Abläufe im humanen, arthrotisch veränderten Gelenkknorpel zu differenzieren, um die Funktion von AQP1 im Krankheitsverlauf konkretisieren zu können. Hierzu sollte das AQP1-Gen in humanen Chondrozyten sowohl überexprimiert als auch herunterreguliert werden, um die Auswirkungen auf ausgewählte anabole und katabole Parameter des chondrozytären Stoffwechsels sowie weiterer Parameter quantifizieren und analysieren zu können.

Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

- Welche Auswirkungen hat ein AQP1-Knockdown auf die Synthese der anabolen Stoffwechselfparameter Kollagen Typ I, II und IX sowie die katabolen Stoffwechselfparameter MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4 und ADAMTS-5?
- Welche Auswirkungen hat die Überexpression von AQP1 auf die o. g. ausgewählten Parameter des anabolen und katabolen Stoffwechsels?
- Welchen Einfluss haben der Knockdown oder die Überexpression von AQP1 auf die Synthese von Lin-2 als zellulärem Bestandteil von Gerüstproteinen, auf Periostin als Protein der EZM und auf den Transkriptionsfaktor SOX9?

Die generierten Daten sollten zu einem verbesserten Verständnis der Pathogenese der Osteoarthritis beitragen. Langfristig könnten sich aus der Klärung der Rolle von AQP1 im Laufe der Erkrankung mögliche neue Therapieansätze ergeben, auf deren Basis positiv modulierend in das Krankheitsgeschehen eingegriffen werden kann.

2 Material

2.1 Verwendete Gewebe

2.1.1 Humanes Knorpelgewebe

Als Grundlage für die Durchführung der experimentellen Untersuchungen diene arthrotisch verändertes, humanes Knorpelgewebe. Das Gewebe wurde intraoperativ im Zuge elektiv geplanter Kniegelenksoperationen entnommen. Nach der Gewebeentnahme erfolgten die weitere Gewebepräparation und die Durchführung der studienspezifischen Experimente in der Abteilung für rheumatologische Grundlagenforschung des Lehrstuhls Rheumatologie an der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim. Die Entnahme des Gewebes wurde mit Zustimmung der Ethikkommissionen der Universitäten Gießen und Regensburg ausgeführt. Das schriftliche Einverständnis für die Entnahme des Knorpelgewebes und dessen weitere Verwendung für experimentelle Zwecke lag vor und wurde dokumentiert. Es wurden Gewebe von 19 Patienten verwendet. Zwei Patienten mussten retrospektiv aufgrund der nachträglich klinisch gestellten Hauptdiagnose „Rheumatoide Arthritis“ aus der Studie ausgeschlossen werden.

2.1.2 Murines Nierengewebe

Zerkleinertes Nierengewebe von Mäusen wurde aufgrund seines hohen Aquaporingehaltes als Material zur Durchführung von Positivkontrollen im Western Blot eingesetzt. Das für experimentelle Forschungszwecke freigegebene Gewebe wurde aus dem o. g. rheumatologischen Forschungslabor zur Verfügung gestellt.

2.2 Chemikalien

Tab. 2: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
5x HF-Puffer	New England BioLabs, Frankfurt/Main
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunn
100 bp-DNA-Leiter	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Lösung 30 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agar	Difco Laboratories GmbH, Heidelberg
Agarose High Resolution	Roth, Karlsruhe
Alkaline Phosphatase, Kälber intestinal	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
AMV-Puffer 5x	Promega, Mannheim
Antibiotisch-Antimykotische Lösung	PAA Laboratories, Cölbe
APS (Amoniumperoxodisulfat)	Roth, Karlsruhe
Aquatex [®]	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brillant Blau R 250	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (bovines Serum Albumin)	Roth, Karlsruhe
CAPS (N-cyclohexyl-3-aminopropan-sulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamin-tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Entellan [®]	Merck Chemicals, Darmstadt
Eosin	Roth, Karlsruhe
FCS (fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hank`s Balanced Salt Solution)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonäure)	PAA Laboratories, Cölbe
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ladepuffer 6x, blau-orange	Promega, Mannheim
Lambda DNA/ <i>Eco</i> RI + <i>Hin</i> III Markers	Promega, Mannheim
Milchpulver, fettarm	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PBS (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Cölbe
PCR Nukleotid Mix	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, PAA Cölbe
peqGOLD Protein Marker IV	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette (Complete Mini)	Roche Diagnostik, Mannheim
RNase-freies dH ₂ O	Applied Biosystems, Darmstadt
RNasin (RNase Inhibitor)	Promega, Mannheim
SDS (SodiumDodecyl Sulfate/Natriumlaurylsulfat)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek® OCT™	Sakura, Staufen
Tris (Tris(hydroxymethyl-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Die tabellarisch nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen.

2.3 Medien

Tab. 3: Verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB (Luria broth) - Medium	Flüssigmedium: 1,5 g Hefeextrakt, 3 g Trypton, 0,15 g NaCl in 300 ml dH ₂ O lösen, autoklavieren, 100 µg/ml Ampicillin zugeben; festes Medium (LB-Agarplatte): Zugabe von 4,5 g Agar vor der Autoklavierung; Lagerung bei 4°C
SOB-Medium	2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 10 mM NaCl in 100 ml dH ₂ O lösen, autoklavieren, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ zugeben; Lagerung bei -20°C
Zellkulturmedium	500 ml DMEM/Ham's F12, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin; Lagerung bei 4°C

Die gebrauchsfertigen Medien Ham's F12 und DMEM/Ham's F12 wurden von PAA Laboratories, Cölbe bezogen.

2.4 Lösungen und Puffer

Tab. 4: Verwendete Lösungen und Puffer. Die Lagerung erfolgte, soweit nicht abweichend vermerkt, bei Raumtemperatur.

Bezeichnung	Zusammensetzung
CAPS-Puffer 10x	22,1 g CAPS, 0,5 g SDS in 900 ml in dH ₂ O lösen, mit 2 N NaOH einen pH von 11,0 einstellen, auf 1000 ml mit dH ₂ O auffüllen
CAPS-Puffer 1x + 10% Methanol (Transferpuffer)	400 ml dH ₂ O, 50 ml CAPS-Puffer 10fach und 50 ml Methanol ineinander lösen
Elektrodenpuffer 10x (Laufpuffer)	30,3 g Tris-Base, 144,0 g Glycin, 10 g SDS in 1000 ml dH ₂ O lösen; Lagerung bei 4°C
Coomassie Blau Entfärbelösung	25 % Methanol, 10 % Essigsäure, Lösungsmittel dH ₂ O
Coomassie Blau Färbelösung	0,25 % Brillant Blau R 250, 40 % Methanol, 8 % Essigsäure, Lösungsmittel dH ₂ O; steril filtrieren; Lagerung bei 4°C
Eosin-Lösung	10 g Eosin in 1 l dH ₂ O lösen, filtrieren und bis zum Gebrauch dunkel lagern; vor Gebrauch einige Tropfen 96 %ige Essigsäure zugeben
Hämalaun	1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, in 1 l dH ₂ O vollständig lösen; 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zugeben, filtrieren; bis zum Gebrauch dunkel lagern
Protein-Lysepuffer	0,05 M Tris und 1 % Nonidet P40 in dH ₂ O lösen; pro 10 ml Lysepuffer eine Proteaseinhibitor-Tablette; Lagerung bei 4°C
SDS-Ladepuffer 6x	100 ml Tris 1 M (pH 6,8), 48 g SDS, 200 ml Glycerin, 50 mg Bromphenolblau, 100 ml β-Mercaptoethanol (14,7 M) ineinander lösen; Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer 1x	40 mM Tris, 20 mM Eisessig und 1 mM EDTA in dH ₂ O lösen; pH 8,0
TBST-Puffer 1x	1,21 g Tris-Base, 8,77 g NaCl, 1,0 g Tween-20 in 1000 ml dH ₂ O lösen
Tris-Puffer 1 M (pH 6,8)	121,14 g Tris in 800 ml ddH ₂ O lösen, mit HCl pH von 6,8 einstellen, mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Herstellung chemisch kompetenter Zellen	
RF1-Lösung	50 mM RbCl ₂ , 20 mM MnCl ₂ x 2H ₂ O, 15 mM KAc, 5 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 1,63 M Glycerin, mit Essigsäure pH von 5,8 einstellen; autoklavieren
RF2-Lösung	2 mM RbCl ₂ , 0,4 mM MOPS, 15 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 1,63 M Glycerin, mit NaOH pH von 6,8 einstellen; autoklavieren

Bezeichnung	Zusammensetzung
Plasmidminipräparation	
P1-Puffer	5 ml Glukose (1 M), 2,5 ml Tris-HCl (1 M/pH 8), 2 ml EDTA (0,5 M/pH 8) mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen und pro ml 10 µl RNase zugeben; Lagerung bei 4°C
P2-Puffer	20 ml NaOH (1 M), 10 ml SDS 10 % mit H ₂ O auf 100 ml auffüllen
P3-Puffer	29,44 g Kaliumacetat in 60 ml H ₂ O lösen, 11,5 ml konzentrierte Essigsäure zugeben, mit H ₂ O auf 100 ml Gesamtvolumen auffüllen; autoklavieren
Zellisolierung aus Gewebe	
Pronaseverdaulösung	0,2 % Pronase (Roche) in Ham's F12 mit 5 % FCS und je 1 % Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B lösen; steril filtrieren; Lagerung bei 4°C
Kollagenaseverdaulösung	200 U/ml Kollagenase Typ 2 (Worthington) in Ham's F12 mit 5 % FCS und je 1 % Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B lösen; steril filtrieren; Lagerung bei 4°C
Enzymatische Ablösung von Zellen aus Zellkulturflaschen	
Pronaseverdaulösung	1 mg/ml Pronase (Roche) in der Hälfte des berechneten Gesamtvolumens lösen und steril filtrieren, Lösungsmittel ist serumfreies DMEM/Ham's F12; die zweite Hälfte des Gesamtvolumens in Form von DMEM/Ham's F12 mit 10 % FCS zugeben; Endkonzentration: 1 mg/ml Pronase und 5 % FCS; Lagerung bei 4°C
Kollagenaseverdaulösung	Stammlösung: 1 mg/ml Kollagenase P (1,5 U/mg) in serumfreien DMEM/Ham's F12 lösen, steril filtrieren; von der Stammlösung benötigtes Volumen mit 0,18 U/ml entnehmen und mit serumfreien DMEM/Ham's F12 auf die Hälfte des berechneten Gesamtvolumens auffüllen; die zweite Hälfte des Gesamtvolumens in Form von DMEM/Ham's F12 mit 10 % FCS zugeben; Endkonzentration: 0,18 U/ml Kollagenase P und 5 % FCS; Lagerung bei 4°C

2.5 Anwendungspakete (Kits)

Tab. 5: Immunologische und molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
AEC Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Amaxa™ Human Chondrocyte Nucleofactor Kit	Lonza Cologne GmbH, Köln
BCA Protein Assay Kit (Pierce®)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Flexi Tube Gene Solution for AQP1-Kit + AllStars Negative Control siRNA	QIAGEN GmbH, Hilden
peqGold Plasmid Miniprep Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAGEN® Maxi Prep. Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kits	QIAGEN GmbH, Hilden
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blotpapier, extra dick	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Deckgläser 20 x 20 mm	Roth, Karlsruhe
Einfrierröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Gewebekulturplatten (6 Well, 96 Well)	Greiner bio-one, Frickenhausen
LightCycler Kapillaren (20µl)	Roche, Mannheim
Objektträger (Superfrost® Plus)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Objektträger, gekammert (Lab-Tek II Chamber Slide)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße für PCR (Multi®-UltraStripes)	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL)	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Corning Incorporated, Corning, NY
Transfermembran (Immobilion-P® PVDF)	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen (Cellstar® 100 x 20 mm)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsieb 70 µm	BD Biosciences, Heidelberg

2.7 Antikörper

Tab. 7: Primärantikörper für Immunhistochemie (IHC) und Western Blot (WB)

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Anti-Aquaporin 1 Antikörper	Maus anti-human	IHC 1:100 WB 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Periostinantikörper	Hase anti-human	IHC 1:8000	Abcam, Cambridge, UK
Alpha-1 type II Collagenantikörper	Maus anti-human	IHC 1:100	Acris Antibodies GmbH, Herford
Anti-Cyclophilin B Antikörper	Hase anti-human	WB 1:2000	Abcam, Cambridge, UK

Tab. 8: Sekundärantikörper für IHC und WB

Bezeichnung	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) Anti-mouse, -rabbit	anti-Maus, anti-Hase	IHC - keine -	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
Anti-Mouse Immunglobulins	Ziege anti-Maus	WB 1:1000	DAKO, Hamburg
Anti-Rabbit Immunglobulins	Ziege anti-Hase	WB 1:5000	DAKO, Hamburg

Tab. 9: Isotypkontrollen für IHC

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Mouse IgG1, k Isotype Control	1:400	BD Biosciences, Heidelberg
Rabbit IgG monoclonal Isotype Control	1:8000	Abcam, Cambridge, UK

2.8 Enzyme

Tab. 10: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
AMV-Polymerase	Promega, Mannheim
Kollagenase Typ 2 (370 U/mg)	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA
Kollagenase P	Roche Diagnostics, Mannheim
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Pronase	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme	
<i>EcoRI</i> <i>EcoRV</i> <i>NcoI</i> -HF™ <i>NotI</i> -HF™	New England BioLabs, Frankfurt/Main
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Frankfurt/Main
<i>Taq</i> DNA Polymerase with ThermoPol® II (Mg-free) Buffer	New England BioLabs, Frankfurt/Main

2.9 Bakterien

Die Transformationen wurden in chemisch kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien vom Stamm DH5 α vorgenommen. Solche Bakterien (OneShot[®] MAX Efficiency[®] DH5 α [™]-T1^R) wurden einerseits von der Firma Invitrogen AG, Carlsbad (USA) bezogen. Zusätzlich wurde ein als Schenkung der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main, zur Verfügung gestellter DH5 α Stamm verwendet (Raleigh et al., 1989). Die chemische Kompetenz dieses Stammes wurde im institutseigenen Labor erzeugt.

2.10 Plasmide

Tab. 11: Verwendete Plasmide*

Bezeichnung	Herkunft
pQE-TriSystem	QIAGEN GmbH, Hilden
pBlueScript KS II (+)	Max-Planck-Institut, Bad Nauheim
pGEM [®] -TEasy Vector	Promega, Mannheim

*Alle verwendeten Plasmide tragen ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin. Die Plasmide pBlueScript KS II (+) und pGEM[®]-TEasy Vector verfügen über das β -Galaktosidase-Gen lacZ.

2.11 Oligonukleotide

Das Entwerfen spezifisch bindender Oligonukleotide (Primerdesign) erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Lucija Berninger, Diplom-Biologin und Frau Anna Balkenhol, biologisch-technische Assistentin in unserer Arbeitsgruppe. Genutzt wurde hierzu das Software-Programm Beacon Designer™, der Firma Premier Biosoft, Palo Alto (USA). Die anschließende Spezifitätskontrolle wurde mittels BLAST® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) durchgeführt. Bezogen wurden die Oligonukleotide (Primer) von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen.

Tab. 12: Verwendete Oligonukleotide, nach Verfahren aufgeschlüsselt. Mit Angabe der Schmelztemperatur ($T_m[^\circ\text{C}]$).

Bezeichnung/Verfahren	Sequenz 5' → 3'	$T_m[^\circ\text{C}]$
qRT-PCR		
ADAMTS4-LB28 (for)	tgtgaaaatgtgtgtgtgct	53
ADAMTS4-LB29 (rev)	ataatccctcactccctgaa	52
ADAMTS5-LB30 (for)	aagctttgtgtcacggtagg	55
ADAMTS5-LB31 (rev)	tgacccttaaattgtcctca	53
Aggrecan-LB32 (for)	tcctcaccatcccctgcta	59
Aggrecan-LB33 (rev)	gcagtgagacctgtcctga	56
AQP1-LB44 (for)	ggtggggaacaaccagacg	50
AQP1-LB45 (rev)	tacatgagggcacggaagatg	49
Coll1-LB1 (for)	caagatgtgccactctgact	56
Coll1-LB2 (rev)	agtctccatgttgagaaga	54
Coll2-LB13 (for)	ctcctggagcatctggagac	56
Coll2-LB14 (rev)	accacgatcaccttgactc	56
Coll9-3-LB18 (for)	aaggaggagaccaggtattgc	56
Coll9-3-LB19 (rev)	tcgactgccagactctcctt	57
Lin-2-LB54 (for)	cccaccctcgagtagtgaa	56
Lin-2-LB55 (rev)	caaaagaggagaccagctgc	56
MMP9-LB24 (for)	ccggaccaaggatacagttt	54
MMP9-LB25 (rev)	cagtgaagcggtagcataggg	55
MMP13-LB26 (for)	tctacacctacaccggcaaa	56
MMP13-LB27 (rev)	ttaggggtgggggtcttcac	53

Bezeichnung/Verfahren	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
qRT-PCR		
Periostin-LB46 (for)	ggattctgatatccgtagag	49
Periostin-LB47 (rev)	gccccaaattgttatacat	47
Sox9-LB34 (for)	acccgtctacacacagctca	58
Sox9-LB35 (rev)	aggggaattctggttgctct	55
AQP1-Amplifikation in PCR		
AQP1-LB42 (for)	aaaccatgggccaccatggccagcgag	71
AQP1-LB43 (rev)	ttgcggccgcctatttgggctcatctcc	71
Schnittstellenüberprüfung im AQP1-Fragment: <i>Nco</i> I (for), <i>Not</i> I (rev)		
AQP1-810-LB48 (for)	tcggcctctctgtagccctt	59
AQP1-810-LB49 (rev)	aagcccagggcagaaccgat	60
Polylinkeramplifikation von pGEM-T Easy Vektor		
pUC/M13 (for)	cgccaggggtttcccagtcacgac	64
pUC/M13 (rev)	tcacacaggaaacagctatgac	55

Für die cDNA-Synthese wurde der Random Hexamer Primer p(dN)₆ der Firma Roche, Mannheim eingesetzt.

2.12 Geräte

Tab. 13: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Amaya Nucleofactor [®] II	Amaya GmbH Biotechnologie, Köln
Biofuge primo R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank (C150)	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank (Heraeus Typ B20)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Horizontale Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, München
Inkubationsschüttler (Certomat [®] H)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
Light Cycler 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Kryostat (Leica CM 3050S)	Leica Microsystems, Nussloch
Mikroskop (Axiovert 200)	Carl Zeiss MicroImaging, Hamburg
Mikroskop (DM IRB)	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskopkamera (DC 200)	Leica Microsystems, Wetzlar
Multifuge 3 S-R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products, Hanau
Neubauer-Zählkammer	Superior, Marienfeld
Photometer (NanoDrop [®])	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Röntgenfilmentwickler (Protec [®] Optimax [®])	PROTEC Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Rotationsschüttler (Unimax1011)	Heidolph Instruments, Schwabach
Sunrise ELISA Reader	Tecan, Crailsheim
Thermocycler (GeneAMP PCR System 9700)	PE Applied Biosystems, Foster City, Californien, USA
ThermoStat plus 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge (5417C)	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot [®] SD (Semi-Dry Transfer Cell)	Bio-Rad Laboratories, München
UV-Transilluminator GVM20	Syngene Europe, Cambridge, UK
Vertikale Gelelektrophoresekammer (Mini-Protean [®] Tetra Cell)	Bio-Rad Laboratories, München

2.13 Computerprogramme

Tab. 14: Verwendete Computerprogramme

Bezeichnung	Hersteller
Beacon Designer™	Premier Biosoft, Palo Alto, USA
Clone Manager	Scientific & Educational Software, Cary, USA
GraphPad Prism® 3.0	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
IM 1000	Leica Microsystems, Wetzlar
LightCycler Software 3.5	Roche Diagnostics, Mannheim
Magellan 5	Tecan, Crailsheim
ND-1000 V3.5.2	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Gewebeentnahme

Im Zuge operativer endoprothetischer Kniegelenksversorgungen von Patienten mit Osteoarthritis erfolgte die Gewebeentnahme in den orthopädischen Fachabteilungen der Universitätskliniken Gießen und Regensburg sowie dem Markus-Krankenhaus in Frankfurt am Main. Intraoperativ wurden die Knochen-Knorpelplatten des Tibiaplateaus und der Femurkondylen abgetragen, in physiologische Kochsalzlösung überführt und umgehend in das Labor an der Kerckhoff-Klinik zur weiteren Bearbeitung versandt. Die erforderlichen Voten der zuständigen Ethikkommissionen und die Einverständniserklärungen der Patienten lagen vor (2.1.1).

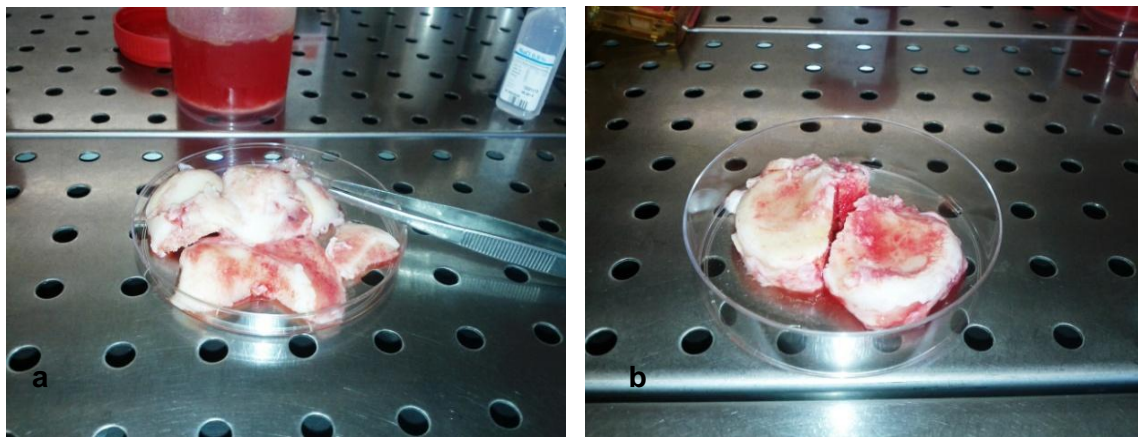


Abb. 9: Resezierte Kniegelenksanteile nach Ankunft im Labor und vor der Weiterverarbeitung. **a** Femurkondyle. **b** Korrespondierendes Tibiaplateau.

3.1.2 Kryokonservierung

Im Labor wurde unter sterilen Kautelen mit Hilfe eines Skalpells das Knorpelgewebe von den knöchernen Anteilen des Resektats gelöst und mehrfach in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen. Das für die Immunhistochemie vorgesehene Gewebematerial wurde nach makroskopischen Gesichtspunkten in stark geschädigte und weniger stark geschädigte Areale unterteilt (Geyer et al., 2009). Das Gewebe wurde mit dem Skalpell in ca. 7x2x7 mm kleine Stücke geschnitten. Von jedem Patienten wurden zwei Gewebeproben gewonnen: Eine Probe aus einem stark geschädigten und eine Probe aus einem weniger stark geschädigten Bereich wurden jeweils in ein kryoprotektives Einbettmedium (Tissue-Tek®) überführt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.1.3 Chondrozytenisolierung

Die Knorpelzellen wurden aus ihrem Gewebsverband enzymatisch herausgelöst. Für diesen enzymatischen Verdauvorgang wurden Gewebeproben aus makroskopisch möglichst gering geschädigten Knorpelarealen ausgewählt. Zur Berechnung der benötigten Verdaulösungen, jeweils 10 ml pro einem Gramm Knorpel, wurde das Gewicht des zerkleinerten Knorpelgewebes bestimmt. Der enzymatische Abbau wurde mit einer Pronaselösung der Konzentration 0,02 g/ml (**Tab. 4**) begonnen. Das Gewebe wurde in der Pronaselösung für 2 h bei 37°C und 60 rpm auf einem Zellkultur-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gewebe mehrfach mit HBSS gewaschen und in 200 U/ml Kollagenase Typ 2-Lösung (**Tab. 4**) bei 37°C und 60 rpm über Nacht auf einem Zellkultur-Schüttler inkubiert. Die entstandene Knorpelzellsuspension wurde über ein Zellsieb (Porenweite 70 µm) gegeben, um unzureichend verdaute Gewebeanteile zu entfernen. Die gereinigte Zellsuspension wurde für 10 min. bei 300 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Knorpelzellen wurden in Zellkulturmedium (**Tab. 3**) resuspendiert, gezählt und je nach Menge in 25 cm² bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. In eine 75 cm² Zellkulturflasche wurden ca. drei Millionen Chondrozyten transferiert.

3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Anzahl vitaler Chondrozyten wurde nach Trypanblau-Färbung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurden die Zellsuspension und Trypanblau im Verhältnis 1:1 versetzt und in die Zählkammer übertragen. Die vitalen Zellen erscheinen unter dem Mikroskop weiß, da ihre Zellmembran intakt ist und sie die Färbelösung nicht aufnehmen. Die Zählung der vitalen Zellen erfolgte quadrantenweise. Ihre Gesamtzellzahl wurde anschließend wie folgt berechnet:

Summe der Zellzahl aller Quadrate : 4 = Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat

Mittelwert der Zellzahl pro Quadrat $\times 10^4$ = Zellen pro ml

3.1.5 Chondrozytenkultivierung als Monolayer

Die in Zellkulturflaschen transferierten Knorpelzellen adhärieren an der Oberfläche des Flaschenbodens und bilden eine konfluente einlagige Schicht (Monolayer) aus. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen und zur Entfernung nicht adhärenter Zellen sowie von Zelltrümmern wurden die Chondrozyten nach 24 h mit HBSS gewaschen und ein Mediumwechsel unter Zugabe von Ascorbinsäure (0,0175 mg/ml) durchgeführt. Bis zum Erreichen von 90 % Konfluenz, ca. 7 bis 10 Tage nach der Zellisolierung, erfolgte alle 48 bis 72 h ein erneuter Mediumwechsel. Die Zellkultivierung fand unter konstanten Bedingungen bei 37°C, einem 5 % CO₂-Anteil in der umgebenden Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % statt.

3.1.6 Transfektion der Chondrozyten

Transfektion bezeichnet in der Molekularbiologie das Einbringen fremden genetischen Materials (DNA, RNA) in eukaryotische Zellen. Es wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden. Bei der transienten Transfektion wird die fremde DNA kurzzeitig in den Zellkern aufgenommen, erzeugt transiente Gen-Expressionsprodukte bzw. unterdrückt deren Bildung und wird innerhalb weniger Stunden bis Tage wieder abgebaut. Von einer stabilen Transfektion wird gesprochen,

wenn ein konstanter Einbau der Fremd-DNA in das Genom der Zielzelle erreicht werden konnte. Das Einschleusen von small interfering RNA (siRNA) ermöglicht die gezielte Unterdrückung der Expression eines Gens (Knockdown). Die Abschaltung eines genau definierten Gens erlaubt, Rückschlüsse auf dessen Funktion zu ziehen. Im Gegenzug kann durch die Transfektion eines entsprechend präparierten Plasmids die Überexpression eines Gens eingeleitet werden. Das effektivste Transfektionsverfahren für Chondrozyten ist die Elektroporation. Bei der Elektroporation wird durch die Abgabe eines kurzen elektrischen Impulses ein temporärer Permeabilitätsanstieg der Zellmembran erreicht. Das einzuschleusende Material kann so in das Zytoplasma der Zelle und von dort mittels Diffusion in den Zellkern gelangen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Amaxa™ Human Chondrocyte Nucleofactor Kit (**Tab. 5**) gearbeitet. Dieses Verfahren wird als Nukleofektion bezeichnet und erreicht eine höhere Transfektionsrate durch Nutzung spezifischer Pufferlösungen (Nucleofactor Solution) in Verbindung mit der Elektroporation. Die Pufferlösungen ermöglichen den aktiven Transport des transfizierten Materials aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

Nach Erreichen von 90 % Konfluenz in der Monolayerkultur und vor Beginn der Zelldifferenzierung wurden die Chondrozyten für die Nukleofektion mit siRNA vorbereitet. Die Chondrozyten wurden mit HBSS gewaschen und enzymatisch von der Zellkulturoberfläche abgelöst. Für eine Flasche mit 75 cm² wurden jeweils 5 ml Pronase- und Kollagenaseverdaulösung (**Tab. 4**) hergestellt. Die Pronaseverdaulösung enthielt 1 mg/ml Pronase und die Kollagenaseverdaulösung 0,18 U/ml Kollagenase P. Nach Zugabe der enzymatischen Lösungen und Inkubation unter den bereits genannten Zellkulturbedingungen wurde der Lösungsprozess der Zellen in ca. 20-minütigen Abständen unter dem Mikroskop beobachtet. Nach Lösung der maximal beobachtbaren Zellzahl vom Flaschenboden nach ca. 3 h wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 300 g für 10 min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in HBSS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Pro Transfektionsansatz wurde eine Million Zellen in 1 ml HBSS gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension gleichmäßig auf Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilt und für 10 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Jedes Zellpellet wurde in 100 µl Nucleofactor Solution resuspendiert. Zur Nukleofektion wurden 2 µl (200 nmol) siRNA zugesetzt. Für jeden siRNA-Transfektionsansatz wurde eine Kontrolltransfektion mit 10 µl (200 nmol) AllStars Negative Control siRNA (**Tab. 5**) durchgeführt. Nach Überführung des Ansatzvolumens in eine Elektroporationsküvette wurde diese in das Nukleofektionsgerät (Amaxa) eingesetzt und das Programm U-24 gestartet.

Anschließend erfolgten die zügige Zugabe von 500 µl Zellkulturmedium und der Transfer der Zellsuspension in 6 well Gewebekulturplatten (für quantitative Real-Time PCR und Western Blot) bzw. auf gekammerte Objektträger, sog. Chamber Slides (für Immunzytochemie), in denen sich bereits 1 ml des auf 37°C vorgewärmten Mediums befand. Die Kultivierung der nukleofizierten Zellen erfolgte analog zur Chondrozytenkultivierung im Monolayer.

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die für die Immunhistochemie gewonnenen, eingebetteten und bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden im Kryostat bei -21°C geschnitten. Die 8 µm dicken Gewebeschnitte wurden auf Objektträger übertragen und in -20°C kaltem Aceton für 10 min. fixiert. Nach einer ca. 30 minütigen Trocknungsphase unter dem Abzug wurden die Gewebeschnitte direkt der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bzw. der immunhistochemischen Färbung zugeführt. Für jeden Patienten wurden Schnittreihen aus stark und weniger stark lädierten Knorpelarealen angefertigt.

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient der histologischen Unterscheidung verschiedener Gewebe- und Zellstrukturen. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen, wie den Zellkern, blau und Eosin azidophile Strukturen, wie die Plasmaproteine, rötlich. Um die unterschiedlichen Strukturen in den angefertigten Gewebeschnitten sichtbar zu machen, wurden diese zunächst für 10 min. in 0,1 % Hämatoxylin-Lösung inkubiert und in H₂O gewaschen. Die Gegenfärbung mit 1 % Eosin-Lösung verlief analog. Anschließend wurden die Schnitte zur Entwässerung für jeweils 5 min. in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (50 %, 70 %, 96 %, 100 %), inkubiert. Nach der Entwässerung wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min. in Xylol

getaucht. Zur Konservierung wurden die Gewebeschnitte mit Eindeckmittel (Entellan[®]) und einem Deckgläschen versehen. Die mikroskopische Analyse und Dokumentation erfolgte innerhalb der nächsten ein bis drei Tage nach vollständiger Trocknung der Präparate.

3.2.3 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen und immunzytochemischen Färbungen beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Kopplung. An das nachzuweisende Protein (Antigen) bindet ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper). Der Primärantikörper oder ein nachgeschalteter Antikörper (Sekundär-, Tertiär- etc. Antikörper) sind mit einem Enzym konjugiert. Nach entsprechender Substratzugabe reagiert das Enzym mit dem Reagenz unter Bildung eines Farbstoffes. Die Farbstoffbildung visualisiert und lokalisiert die immunhistochemische Reaktion.

Zum Nachweis von AQP1 und Perioestin in den Gefrierschnitten wurden immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Die Objektträger mit den Gefrierschnitten wurden 5 min. in PBS gewässert. Anschließend erfolgte zur Blockierung unspezifischer Bindungen deren Inkubation mit 5 % Magermilchpulverlösung (Lösungsmittel PBS) bei hoher Luftfeuchtigkeit (feuchte Kammer) und Raumtemperatur für 1 h. Über Nacht (ca. 20 h) wurde die Inkubation mit den primären Antikörpern (**Tab. 7**) bei 4°C durchgeführt. Der Inkubation folgte eine dreimalige Waschung der Präparate für jeweils 5 min. in PBS und das Blocken der endogenen Peroxidasen für 30 min. bei 4°C mit 0,6 % methanolischer Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach erneuter dreimaliger Waschung der Präparate für 5 min. in PBS wurde die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Histofine für 30 min. bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nochmals wurde ein dreimaliger 5 minütiger Waschschrift eingeschoben. Um unspezifische Bindungen zu erkennen, wurden entsprechende Isotypkontrollen (**Tab. 9**) mitgeführt. Dem gleichen Ziel sowie dem Ausschluss von Kreuzreaktivitäten diente als Negativkontrolle die alleinige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (**Tab. 8**). Die Inkubation mit einem primären Antikörper gegen Kollagen II sollte den ordnungsgemäßen Ablauf der Färbungsreaktion anzeigen und somit als Positivkontrolle dienen. Als Reagenzkontrolle wurde weder mit einem Primär- noch mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Mit Hilfe des AEC Substrate Kit (**Tab. 5**) wurde die Entwicklerlösung nach Herstellerangaben

angesetzt, auf die Präparate pipettiert und die Farbentwicklung unter dem Mikroskop beobachtet. Je nach Farbentwicklung, spätestens aber nach 20 min., wurde die Farbreaktion mit PBS gestoppt. Hierzu wurden die Präparate mindestens 5 min. in PBS belassen. Zur Konservierung wurden die Präparate mit Aquatex® eingedeckelt. Die mikroskopische Beurteilung und Dokumentation erfolgte analog zu den HE gefärbten Gewebeschnitten.

3.2.4 Immunzytochemie

Das Transfektionsergebnis wurde mittels Immunzytochemie sichtbar gemacht. Jedem mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierten Zellansatz war als Negativkontrolle ein mit AllStar-RNA nukleofizierter Ansatz zugeordnet (3.1.6). Die auf Chamber Slides ausgesäten nukleofizierten Chondrozyten wurden am ersten Tag nach der Nukleofektion und zur Verlaufsbeobachtung zu weiteren unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 3 bis Tag 7) angefärbt. Hierzu wurden die Objektträger nach Entfernung des Mediums und des Kammeraufsatzes für 5 min. in PBS gewaschen und für 10 min. in -20 °C kaltes Aceton überführt. Die weitere Durchführung entspricht dem Ablauf der immunhistologischen Färbung gegen AQP1. Lediglich die Waschschrte mit PBS wurden von drei Waschungen à 5 min., auf eine 5 minütige Waschung begrenzt. Nach dem Abstoppen der Färbung in PBS wurden die Objektträger zur Darstellung der Kernmorphologie für 5 s in Hämalun getaucht. Nach Waschung in Leitungswasser folgte das Eindeckeln mit Aquatex®. Die fotografische Dokumentation zeigt die nukleofizierten Zellen vor, während und direkt nach Abschluss der immunzytochemischen Färbung.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Bakterienkultivierung

Die Bakterien wurden in flüssigem oder auf festem LB-Medium (**Tab. 3**) kultiviert oder als Glycerin-Dauerkultur gelagert.

Selektiertes Bakterienmaterial wurde initial als Flüssigkultur angelegt und hierzu von der LB-Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze abgenommen und einschließlich der Pipettenspitze in 2-10 ml LB-Medium transferiert. Über Nacht wurde diese Kultur bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Sollte die Bakteriendichte erhöht werden, wurden 200 µl von der Übernachtskultur abgenommen und in 100 ml LB-Medium überführt. Dieser Kulturansatz wurde ebenfalls über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Die Kultivierung auf festem LB-Medium diente lediglich dem Zwischenschritt der Transformation (3.3.3). Zur Herstellung einer solchen LB-Agarplatte wurde das noch warme flüssige Medium in sterile Zellkulturschalen gegossen. Nach dem Trocknen und Auskühlen konnten die Platten bei 4°C für ca. 4 Wochen gelagert werden.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Für ihre Herstellung wurden 1600 µl einer Flüssigkultur und 400 µl 100 % Glycerin in ein Einfrierröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Für die erneute Anlage einer Flüssigkultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze über die gefrorenen Bakterien gestrichen, um die Pipettenspitze anschließend für die Beimpfung in flüssiges LB-Medium abzuwerfen.

3.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Fähigkeit von Zellen, DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen, wird als Kompetenz bezeichnet. Einige Bakterienarten besitzen eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA. Künstliche Kompetenz kann durch chemische oder elektrische Vorbehandlung erreicht werden. Die hierzu einsetzbaren Verfahren erhöhen die Permeabilität der Zellmembran und steigern somit die Aufnahmefähigkeit der Zellen.

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* vom Stamm DH5 α wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml einer LB-Übernachtskultur von *E. coli* beimpft. Der Kulturansatz wurde bei 37°C und 150 rpm auf einem Schüttler inkubiert, bis bei 600 nm eine Optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 – 0,6 im BioPhotometer gemessen werden konnte. War die gewünschte OD₆₀₀ erreicht, wurde die Kultur gleichmäßig auf zwei Reaktionsgefäße (50 ml) verteilt und für 15 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min. bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 10 ml RF1-Lösung (**Tab. 4**) pro Ansatz resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden für 1-2 h auf Eis inkubiert und erneut für 15 min. bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellsediment wurde nach Entfernung des Überstandes mit 2 ml RF2-Lösung (**Tab. 4**) pro Ansatz versetzt und für 15 min. auf Eis inkubiert. Die nun chemisch kompetenten Zellen wurden abschließend aliquotiert (100 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäße) und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.3.3 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Transformation ist die Aufnahme fremden genetischen Materials in Bakterien. Voraussetzung für die Transformierbarkeit von Bakterien ist deren Kompetenz. Als Vektoren für Fremd-DNA werden Plasmide eingesetzt. Plasmide sind ringförmige DNA-Moleküle, die unabhängig vom Bakteriengenom in hoher Kopienzahl vervielfältigt werden können. Plasmide tragen häufig Selektionsmarker, Genabschnitte, die z. B. für eine Antibiotikaresistenz oder eine Enzymreaktion kodieren. Hieraus ergeben sich verschiedene Möglichkeiten zur Kontrolle einer erfolgreichen Transformation.

Für einen Transformationsansatz auf Basis der Antibiotikaresistenz wurden 100 μ l chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-10 μ l Plasmid-DNA (**Tab. 11**) mit Kodierung für Ampicillin-Resistenz für 30 min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 45 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Anschließend wurden dem Ansatz 1 ml SOB-Medium zugegeben und dieser für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugieren des Ansatzes für 5 min. bei 13.000 rpm wurde der größte Teil des Überstandes verworfen. Mit dem verbliebenen Überstand wurde das Sediment resuspendiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte (**Tab. 3**) ausplattiert. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht. Die so selektierten Bakterienkolonien wurden zur weiteren Kultivierung in flüssiges LB-Medium überführt.

Als weitere Möglichkeit zum Nachweis potentiell transformierter Bakterien auf Basis einer Enzymreaktion konnte bei zwei der verwendeten Plasmide das sog. Blau-Weiß-Screening genutzt werden. Diese Plasmide besitzen eine Gensequenz (*lacZ*), die für das Enzym β -Galactosidase codiert. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird die Expression der β -Galactosidase induziert werden. Das Enzym kann 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) hydrolysieren. Ein Abbauprodukt dieser Reaktion reagiert mit Luftsauerstoff unter Bildung eines blauen Farbstoffes. Künstlich hergestellte Plasmide tragen in der enzymkodierenden Plasmidsequenz einen sogenannten Polylinker (auch Multiple Cloning Site). Wird Fremd-DNA in die Polylinker-Region eingefügt, ist die Gensequenz der β -Galactosidase unterbrochen. Das Enzym kann nicht mehr exprimiert und X-Gal nicht mehr gespalten werden. Erfolgreich transformierte Bakterienkolonien, die ein Plasmid mit Fremd-DNA enthalten, erscheinen weiß. Transformierte Bakterienkolonien mit unverändertem Plasmid erscheinen blau. Hierzu wurden die ampicillinhaltigen LB-Agarplatten zusätzlich mit X-Gal in Verbindung mit IPTG präpariert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Plasmidisolierung

Die Plasmid-DNA kann aus Bakterien wieder separiert werden. Voraussetzung ist der alkalische Zellaufschluss und die Entfernung der restlichen Zellbestandteile. Die DNA kann nach der Zelllyse entweder durch direkte Fällung oder unter Verwendung von DNA-bindender Matrix (Trennsäulen) isoliert werden. In Abhängigkeit von den Ausgangsmengen wurde die Plasmidisolierung als Mini- bzw. Maxipräparation durchgeführt.

Für die Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der direkten Fällung wurden 4 ml Übernachtskulturen auf 2 bis 3 Reaktionsgefäße verteilt und 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet durch Vortexen in 200 μ l P1-Puffer (**Tab. 4**) resuspendiert. Zu der entstandenen trüben Lösung wurden 300 μ l P2-Puffer (**Tab. 4**) zugegeben. Die Mischung musste durch vorsichtiges Schwenken erreicht werden, da zu diesem Zeitpunkt die Trennung von chromosomaler

Bakterien-DNA und Plasmid-DNA erfolgte. Zu starke Scherkräfte könnten zu chromosomalen Bruchstücken und somit zu Verunreinigungen führen. Erschien die Lösung klar, wurde sie vorsichtig mit 300 µl P3-Puffer gemischt und für 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min. bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und 700 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung wurden 600 µl Isopropanol zugegeben und die Ansätze erneut für 10 min. bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und unter den vorherigen Bedingungen zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet für 30 min. bei 37°C getrocknet. Die Lösung des Pellets erfolgte nach Zugabe von 30 µl dH₂O für 30 min. bei Raumtemperatur.

Der verbesserten Aufreinigung der Plasmid-DNA diene die Verwendung des Miniprep[®] Kit bzw. Maxi Prep.[®] Kit (**Tab. 5**). Beide Anwendungspakete arbeiten unter Verwendung von Trennsäulen und wurden den Herstellerangaben entsprechend gehandhabt.

Die Analyse der Plasmidlösungen erfolgte im NanoDrop[®]-Photometer und durch Elektrophorese in 1,5 % Agarosegel.

3.4.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von RNA aus kultivierten Chondrozyten (nukleofizierte und nicht nukleofizierte Zellen) wurde das RNeasy Mini Kits eingesetzt. Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Mit dem im Kit enthaltenen Puffer wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde in ein Trennsäulensystem auf Silika-Gel-Membranen übertragen, an welche die RNA binden konnte. Durch mehrere Waschschrte wurde die RNA gereinigt und am Ende eluiert. Die exakte Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert oder im unmittelbaren Anschluss an die Isolierung in cDNA umgeschrieben.

3.4.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben von RNA in cDNA. Die hohe Anfangstemperatur von 70°C ermöglicht das Aufschmelzen der RNA-Sekundärstrukturen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur können zufällig bindende Hexamer-Primer an der RNA hybridisieren. Eine Reverse Transkriptase (RT) synthetisiert mit Hilfe von Nukleotiden anhand der RNA-Vorlage die cDNA (Extension). Die unspezifische Primerbindung ist die Voraussetzung dafür, dass alle RNA-Bereiche in der cDNA vertreten sind.

Für einen ReaktionsAnsatz wurden 1–3 µg RNA zusammen mit 1 µl RNase-Inhibitor in dH₂O (RNase frei) ad 50 µl Gesamtvolumen gelöst und für 2 min. bei 70°C inkubiert. Die anschließende Lagerung auf Eis erfolgte bis zur Zugabe des folgenden Ansatzes:

Reagenz	Menge
AMV-Puffer 5x	10 µl
PCR Nukleotid Mix	3–5 µl
AMV-Polymerase (RT)	2 µl
Random Hexamer Primer p(dN) ₆	1 µl

Die Reverse Transkription erfolgte im Thermocycler bei folgendem Programm:

Phase	Temperatur	Zeit
Primer Annealing	25°C	15 min.
Zwischenschritt	37°C	5 min.
Extension	42°C	60 min.
Extension	55°C	30 min.
Inaktivierung der AMV-Polymerase	72°C	10 min.

Die cDNA wurde bei –20°C gelagert.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die gezielte Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen. Der DNA-Doppelstrang wird durch hohe Temperaturen denaturiert. An die entstandenen Einzelstränge können nach rascher Abkühlung spezifische Primer binden. Die Primer kennzeichnen den zu amplifizierenden Bereich. Durch die Zugabe von Nukleotiden und einer DNA-Polymerase werden die Einzelstränge zu jeweils zwei Doppelsträngen komplementiert (Elongation). Die Reaktionszyklen können mehrmals wiederholt und somit hohe Replikationsraten erreicht werden.

Zur Amplifikation von AQP1-Fragmenten aus cDNA wurde folgender Reaktionsansatz (50 µl) hergestellt:

Reagenz	Menge
5x HF Puffer	10 µl
PCR Nucleotid Mix (10 mM)	1 µl
Forward Primer (10 µM)	2,5 µl
Reverse Primer (10 µM)	2,5 µl
DNA-Vorlage	2 – 16 µl
Phusion®-Polymerase	0,5 µl
dH ₂ O	ad 50 µl

Pipettiert wurde in ein auf Eis gekühltes PCR-Reaktionsgefäß. Als letztes Reagenz wurde die Polymerase hinzugegeben. Die Amplifizierung erfolgte in 40 Zyklen im Thermocycler bei folgendem Programm:

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Denaturierung	98°C	10 s
Primer Anneling	65°C	30 s
Elongation	72°C	40 s
Finale Elongation	72°C	10 min.

Die Fragmentkontrolle wurde im Anschluss mittels Elektrophorese in 1,5 % Agarosegel durchgeführt. Die nach Eluierung aus dem Gel gewonnen AQP1-Fragmente wurden direkt der Ligation (3.4.7) zugeführt oder bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C gelagert.

3.4.5 Quantitative Real-Time PCR

Das Verfahren der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) mittels LightCycler wurde zur Quantifizierung der aus nukleofizierten Chondrozyten isolierten RNA, die zuvor in cDNA umgeschrieben wurde, eingesetzt. Verwendet wurde das Quanti Tect SYBR Green Kit. Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR Green, das spezifisch an doppelsträngige DNA bindet (interkaliert). Mit der Zunahme der PCR-Produkte während eines Zyklus nehmen auch die Fluoreszenzsignale zu. Die Messung der Fluoreszenzsignale wird während eines PCR-Zyklus in Echtzeit („Real Time“) durchgeführt. Die Menge der PCR-Produkte steigt von Zyklus zu Zyklus an. Die Fluoreszenz entwickelt sich proportional.

Zur Gewährleistung der relativen Quantifizierung wurde als Referenzgen 18s rRNA eingesetzt und als paralleler Ansatz mitgeführt. Die vom LightCycler ermittelten Messwerte (C_t -Werte) gingen in die Berechnung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ein. Die LightCycler-Software kann so unterschiedliche Expressionen als x-fache Änderung bzw. Regulation angeben. Die der Berechnung zugrunde liegende Formel lautet: $2^{-\Delta\Delta C_t} = \text{x-fache Änderung}$. Als Referenz nimmt das LightCycler-Programm einen Regulationsfaktor (RF) von 1 an. Bevor Messungen stattfinden konnten, die eine

relative Quantifizierung ermöglichen, mussten die Bedingungen für alle Primerpaare optimiert und an das Referenzgen angepasst werden. Für eine relative Quantifizierung unter optimalen Bedingungen wurde ein Effizienzbereich von $2 \pm 0,05$ ermittelt.

Für die Messungen wurde pro LightCycler-Kapillare folgender 20 µl qRT-PCR Ansatz hergestellt:

Reagenz	Menge
SYBR Green	10 µl
cDNA	2 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
MgCl ₂	3–4 mM
dH ₂ O	ad 20 µl

Nach dem Transfer der Ansätze in die Kapillaren wurden diese verschlossen und in das LightCycler-Karussell eingesetzt und zentrifugiert. Die Messungen erfolgten im LightCycler innerhalb von 40 Zyklen bei folgendem Programm:

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 min.
Denaturierung	95°C	5 s
Primer Anneling	s. Tab. 12	20 s
Elongation	72°C	30 s

3.4.6 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau dient dem Schneiden von DNA an bestimmten Positionen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Die Methode wurde eingesetzt zur Restriktion von DNA-Fragmenten aus der PCR, von Plasmid-DNA nach Isolierung, zur Linearisierung von Plasmiden und nach Ligationen als Erfolgskontrolle. Die eingesetzten Restriktionsenzyme (**Tab. 10**) erkennen und schneiden an spezifischen Basensequenzen. Schneidet das Enzym gerade, entstehen glatte Enden (blunt ends). Erfolgt der Schnitt versetzt, entstehen klebrige, kohäsive Enden (sticky ends). Die spezifischen Schnittstellen eines künstlich hergestellten Plasmids liegen in der Polylinker-Region.

Grundlage für alle Restriktionen war folgender 15 µl Ansatz:

Reagenz	Menge
DNA	0,5–1,0 µg
Restriktionsenzym	0,5 µl pro Enzym
10 x BSA	1,5 µl
Puffer Nr. 4	1,5 µl
dH ₂ O	ad 15 µl

Der Restriktionsansatz wurde über Nacht für ca. 16–18 h bei 37°C inkubiert. Wenn erforderlich (entsprechend den Herstellerangaben), wurde die Enzymaktivität anschließend durch Hitzeinaktivierung unterbrochen. Die Auswertung erfolgte wiederum mittels Elektrophorese in 1,5 % Agarosegel.

3.4.7 Ligation

Die Ligation ermöglicht die Verbindung von DNA-Fragment und Plasmid. Voraussetzung ist die Linearisierung des zirkulären Vektors (Plasmid) im Restriktionsverdau. Das DNA-Fragment wird mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Es entstehen komplementäre Enden, die sich im Idealfall aneinander lagern. Kohäsive Enden fügen sich leichter zusammen als glatte Enden. Mit Hilfe einer DNA-Ligase werden die Enden des Plasmids und des DNA-Fragmentes miteinander verknüpft. Es kommt zu Ausbildung von Phosphodiester-Bindungen. Nicht alle Plasmide nehmen das DNA-Fragment auf. Ein Grund kann die vorzeitige Schließung (Autoligation) des Plasmids sein. Zur Autoligation kann es nur bei Plasmiden mit glatten Enden kommen. Die Zugabe von alkalischer Phosphatase verhindert die Autoligation der Plasmidenden, indem sie die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Die Effektivität der Ligation kann so gesteigert werden.

Es wurden 0,5 µl alkalische Phosphatase entweder dem Ligations- oder bereits dem Restriktionsansatz zugegeben. Für die Ligation wurde T4 DNA Ligase (**Tab. 2**) verwendet. Die Ansatzpräparierung erfolgte nach Herstellerangaben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend transformiert.

Eine weitere Möglichkeit Vektor und DNA-Fragment zu verbinden, stellt die TA-Klonierung dar. TA-Plasmide sind linearisiert und besitzen an ihrem 3'-Ende einen Thymidinüberhang. Der Basenüberhang wirkt ähnlich den kohäsiven Enden. Eine Ligase verknüpft die Enden. Die Restriktion von DNA-Fragment und Plasmid ist nicht nötig. Das Verfahren lässt allerdings keine gezielte Orientierung des DNA-Fragments im Plasmid zu. Die Wahrscheinlichkeit der gewünschten Genexpression liegt demzufolge bei ca. 50 %. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Ligation das pGEM®-T Easy Vektor System der Firma Promega verwendet. Die Ligation wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Transformation zur Vervielfältigung (Klonierung) des DNA-Fragments.

3.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

DNA ist durch die enthaltenen Phosphatgruppen natürlicherweise negativ geladen. Aufgrund dieser Eigenschaft wandern DNA-Fragmente im elektrischen Feld der Elektrophoresekammer zur Anode. Aufgetragen auf ein Agarosegel, welches als molekulares Sieb wirkt, erfolgt in der Kammer die Auftrennung der Fragmente nach Größe und Ladung in Banden. Zur Abschätzung der Fragmentgröße diente ein mitgeführter Standard. Das Verfahren wurde zur Größenbestimmung der amplifizierten DNA-Fragmente nach PCR, der Plasmid-DNA nach Isolation, zur Konzentrationsbestimmung sowie als Erfolgskontrolle von Plasmidrestriktionen eingesetzt. Die Proben wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Für die Gelherstellung und Fragmentauftrennung in isotonischer Pufferlösung wurde TAE-Puffer (**Tab. 4**) verwendet. Die Proben wurden mit 3–5 µl Ladepuffer 6x (**Tab. 2**) versetzt. Der Probenlauf erfolgte unter einer konstanten Spannung von 80 V. Als Größenstandard wurde je nach erwarteter Fragmentgröße eine 100 bp DNA-Leiter oder der Lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII* Marker (**Tab. 2**) mitgeführt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt, die Banden mittels UV-Licht (254 nm) visualisiert und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Die Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert. Die Extraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (50) (**Tab. 5**) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration der eluierten DNA konnte photometrisch (NanoDrop®) bestimmt und die DNA für weitere Versuche verwendet werden.

3.4.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA-Fragmente wurden von der Firma GATC Biotech in Köln, basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Frederick Sanger, durchgeführt.

3.5 Proteinchemische Methoden

3.5.1 Zellpräparation und Zelllyse

Für den AQP1-Nachweis im Western Blot wurden Proteinlysate von nicht-transfizierten (unbehandelten) sowie von mit siRNA (für AQP1 und AllStars Negative Control) nukleofizierten Chondrozyten hergestellt und deren Proteinkonzentration bestimmt. Zur Vorbereitung wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit HBSS gewaschen und 100 µl Protein-Lysepuffer (**Tab. 4**) je well einer 6-Well-Gewebekulturplatte hinzu gegeben. Die Pufferlösung wurde mehrfach resuspendiert und gleichmäßig über dem Flaschenboden verteilt. Mittels Zellschaber wurde über den Flaschenboden gewischt, das entstandene Lysat aufgenommen und aliquotiert (à 50 µl). Die Lysatlagerung erfolgte bei -20°C.

3.5.2 Quantitative Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysate wurde mit dem BCA Protein Assay Kit nach Pierce® (**Tab. 5**) gearbeitet. Die Proteinbestimmungsmethode beruht auf der quantitativen Reaktion von Kupferionen mit Proteinen, die nach Zugabe von Bicinchoninsäure (BCA) violett erscheinen. Die Absorption des entstandenen Farbkomplexes kann photometrisch gemessen werden. Auf diese Weise wird das Gesamtprotein quantifiziert, eine Differenzierung der Proteine ist nicht möglich.

Für die Erstellung einer Eichgeraden wurde BSA (0 bis 2 mg/ml) verwendet. Von dem Proteinlysate wurde mit Lysepuffer eine Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 1:1, 1:5 und 1:10 angefertigt. Jeweils 25 µl der unterschiedlich konzentrierten Proteinlysate und BSA-Lösung wurden pro well einer Mikrotiterplatte (96 Well) pipettiert und 200 µl Working Reagent zugegeben. Nach kurzem Mischen (ca. 30 s) durch kreisende Bewegungen auf einer festen Unterlage erfolgte die Inkubation bei 37°C für 30 min.. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte danach bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Sunrise ELISA Reader.

3.5.3 Proteinauftrennung mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteinlysate wurde das Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) nach Laemmli (1970) eingesetzt. Die Methode erlaubt die Proteinauftrennung allein nach deren Molekulargewicht (M). Um dies zu erreichen wird sowohl dem Gel als auch dem Laufpuffer SDS zugegeben. SDS denaturiert die Proteine und überzieht sie mit einer einheitlichen positiven Ladung. Im elektrischen Feld können die entstandenen Proteinuntereinheiten unabhängig von ihrer Form und Ladung zur positiv geladenen Anode wandern. Die Zugabe von reduzierenden Thiolen (z. B. β -Mercaptoethanol) zum Ladepuffer fördert die Denaturierung der Proteine durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken. Die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE beinhaltet die Herstellung eines zwei-teiligen Polyacrylamidgels. Das obere pH-neutrale, weitporige Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine. Im unteren engporigen Trenngel mit basischen pH erfolgt deren eigentliche Separation. Die Kombination der Gele ermöglicht schärfere Proteinbanden.

Die Herstellung des zweiteiligen Gels erfolgte anhand der folgenden Pipettierschemata:

Sammelgel 5 %		Trenngel 12 %	
Ansatzvolumen: 4 ml		Ansatzvolumen: 15 ml	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
H ₂ O	2,7 ml	H ₂ O	4,9 ml
Acrylamid-Lösung 30 %	0,67 ml	Acrylamid-Lösung 30 %	6,0 ml
TRIS 1,0 M (pH = 6,8)	0,5 ml	TRIS 1,5 M (pH = 8,8)	3,8 ml
SDS 10 %	0,04 ml	SDS 10 %	0,15 ml
APS 10 %	0,04 ml	APS 10 %	0,15 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,006 ml

Nach Überführung des fertigen Gels in eine vertikale Gelelektrophoresekammer, wurde diese mit 1 % Laufpuffer aufgefüllt. Die Proteinlysate wurden im Verhältnis 6:1 mit SDS-Ladepuffer (x6) versetzt und für 5 min. bei 95°C denaturiert. Als Positivprobe wurde eine ebenso behandelte Lysatprobe murinen Nierengewebes mitgeführt. Pro Geltasche wurden 60–80 μ l aufgeladen und für 2–3 h eine Spannung von 80–120 V

angelegt. Als Größenstandard wurde der pEqGOLD Protein Marker IV mitgeführt, geeignet für eine Größenbestimmung von 17–170 kDa. Die Analyse der Gele konnte anschließend im Western Blot und mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung erfolgen.

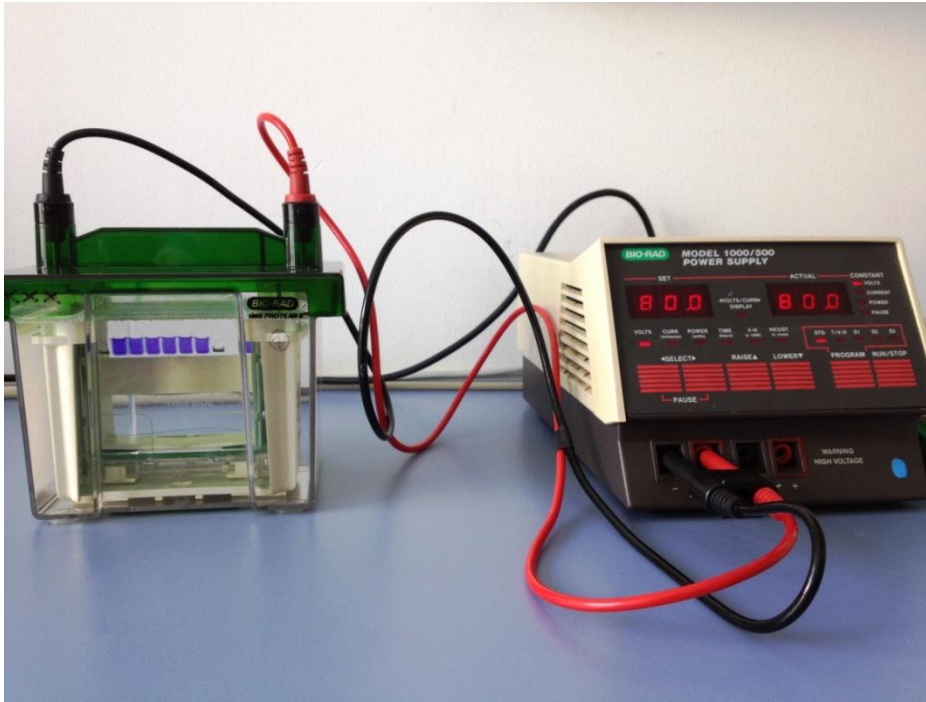


Abb. 10: Zur Durchführung der SDS-PAGE verwendete Apparaturen. Links: Vertikale Gelelektrophoreskammer mit beladenem Gel. Rechts: Spannungsquelle.

3.5.4 Western Blot

Diese Methode ermöglicht den Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern. Hierzu müssen die Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden. Im Anschluss können sie von dem Polyacrylamidgel auf eine geeignete Membran übertragen (blotting) und mit spezifisch-bindenden Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert werden. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches unter Zugabe einer sog. Entwicklerlösung eine chemische Reaktion dahingehend katalysieren kann, dass es zur Freisetzung von Licht als chemische Lumineszenz kommt. Dieses Licht ist in der Lage einen Röntgenfilm zu belichten. Unter Einsatz dieser Technik können die gesuchten Proteine als dunkle Banden auf dem Röntgenfilm visualisiert werden.

Zur Durchführung des Western Blots wurde zunächst eine der Größe des Gels entsprechende Trägermembran zugeschnitten. Gewählt wurde eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran. Die PVDF-Membran (Immobilion-P® PVDF) wurde zur Aktivierung für ca. 10 s in Methanol gelegt. Anschließend wurde die Membran für insgesamt 10 min. in CAPS-Puffer (Transferpuffer 1x) auf einem geeigneten Rollenmischer geschwenkt. Gleichzeitig wurden zwei dicke Blotpapiere in CAPS-Puffer getränkt. Für den Proteintransfer nach dem semi-dry-Verfahren wurde mit der Trans-Blot® SD-Kammer gearbeitet. Die Schichtung der vorbereiteten Komponenten in der Kammer erfolgte von unten (Anode) nach oben (Kathode) in folgender Reihenfolge: ein dickes Blotpapier, PVDF-Membran, Gel, zweites dickes Blotpapier. Durch vorsichtiges Rollen mit einem Reaktionsgefäß (15 ml) wurden eventuell entstandene Luftblasen entfernt. Das folgende Blotting in der Kammer erfolgte bei 60 mA für ca. 1h. Die PVDF-Membran wurde im unmittelbaren Anschluss orientierend markiert und der Antikörperdetektion zugeführt. Das Polyacrylamid-Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau eingefärbt.

Nach dem Blotting wurde die PVDF-Membran in ein Reaktionsgefäß (50 ml) überführt. Es folgten die Blockierung unspezifischer Bindungen, durch die Zugabe von 5 % Milchpulverlösung (5 ml) und die Inkubation für 1 h und 30 min. bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer. Die Herstellung der hierzu und im weiteren Verlauf verwendeten Milchpulverlösung erfolgte durch Lösung des Milchpulvers in TBST-Puffer mit anschließender Filtration. Nach Entfernung der Milchpulverlösung wurde die PVDF-Membran mit dem gewünschten Primärantikörper (**Tab. 6**) über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Als Trägermedium für alle im Zuge des Western Blots verwendeten Antikörper dienten 5 ml der 5 % Milchpulverlösung mit einer im Folgenden gesondert erwähnten Ausnahme. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die PVDF-Membran dreimal für jeweils 15 min. mit TBST-Puffer gewaschen und danach mit dem entsprechenden Sekundärantikörper bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran wie zuvor mit TBST-Puffer gewaschen. Nach der Waschung wurde die PVDF-Membran vorsichtig auf eine Folie gelegt und mit 1 ml Entwicklerlösung (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate) gleichmäßig benetzt. Die Folie wurde luftblasenfrei verschlossen und die Membran 2-3 min. inkubiert. Danach wurde die abgetropfte Membran in einer neuen Folie luftblasen und -faltenfrei verpackt, ein Röntgenfilm aufgelegt und exponiert. Die Belichtungszeit variierte von 2 s bis 20 min. Die Entwicklung der verwendeten Röntgenfilme erfolgte mit Hilfe eines entsprechenden

Gerätes (Protec® Optimax®). Das Ergebnis wurde analysiert und durch Scannen der Filme digitalisiert.

Ein Western Blot kann nacheinander mit verschiedenen Antikörpern inkubiert und entwickelt werden, da die Proteine fest an die PVDF-Membran binden. Diese Eigenschaft ermöglicht weitere Proteinnachweise, unter anderem zur Generierung von Ladekontrollen. Mit Hilfe von Ladekontrollantikörpern kann die gleichmäßige Proteinbeladung der verschiedenen Bahnen eines Gels kontrolliert werden. Auf diese Weise wird ein Vergleich der Proteinexpression zwischen den verschiedenen Proben möglich. Als Ladekontrollprotein für den AQP1-Western Blot wurde Cyclophilin B gewählt. Für den Nachweis des Ladekontrollproteins wurde die Membran zunächst mehrfach (3–5 mal für jeweils 15 min.) mit TBST-Puffer gewaschen. Nach dem anschließenden Abblocken der Membran mit Milchpulverlösung wurde die Antikörperdetektion (wie zuvor beschrieben) mit einem Cyclophilin B-Antikörper (**Tab. 6**) durchgeführt. Für den passenden Sekundärantikörper (**Tab. 7**) wurde abweichend von den sonst verwendeten Antikörpern eine 10 % Milchpulverlösung (ebenfalls filtriert) als Trägermedium eingesetzt.

3.5.5 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung ermöglicht die unspezifische Färbung von Proteinen. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel unter leichtem Schütteln für ca. 20 min in die Färbelösung (**Tab. 4**) gelegt. Anschließend wurde es für mehrere Stunden, erneut unter leichtem Schütteln, in Entfärbelösung (**Tab. 4**) inkubiert. Die Entfärbelösung wurde mehrfach gewechselt, bis die sichtbaren Proteinbanden gut zu differenzieren waren. Das Färbeergebnis wurde digital fotografiert und das Gel verworfen.

3.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der in der qRT-PCR gewonnenen Werte erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware GraphPad® Prism Version 3.0 (**Tab. 14**). Bei Normalverteilung der Werte wurde der t-Test für unpaarige angewendet. Bei nicht-normaler Verteilung der Werte wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test eine non-parametrische Varianzanalyse (ANOVA) in Verbindung mit Dunn`s Multiple Comparsion post-hoc Test durchgeführt. Das Konfidenzintervall zur Wiederlegung der Nullhypothese wurde auf 95 % mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % bei $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Expressionsanalysen

4.1.1 Aquaporin 1

Die Analyse der angefertigten Gefrierschnitte zeigte in den HE gefärbten Präparaten die typischen Veränderungen des arthrotischen Knorpels (**Abb. 11**): Vermehrte Zelldichte, Clusterbildung (Pfeile in **Abb. 11b**), Rissformationen (Söder & Aigner, 2011).

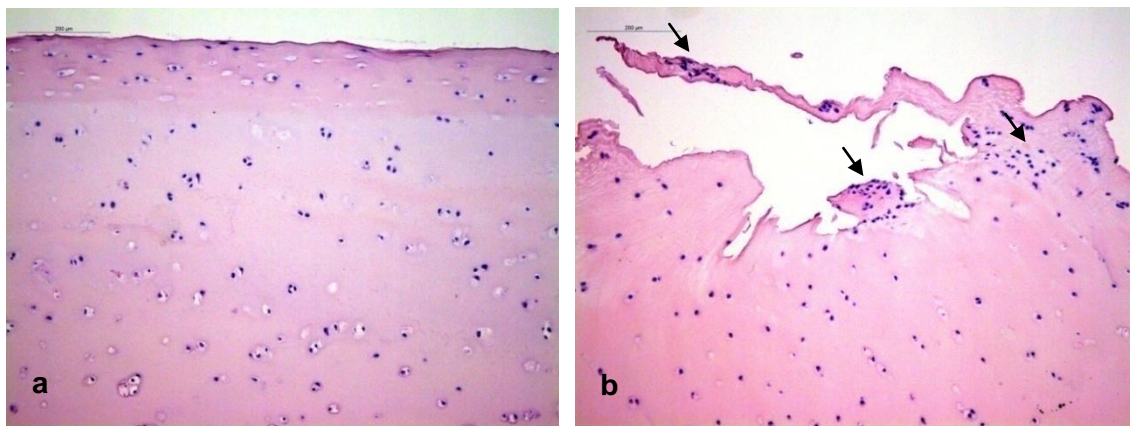


Abb. 11: Orientierende Primärfärbung mit Hämatoxin-Eosin zur Darstellung der unterschiedlich betroffenen Knorpelareale eines Operationspräparates (Vergr. 10x). **a** Präparat aus makroskopisch nicht bzw. gering geschädigtem Bereich. **b** Präparat aus makroskopisch stark geschädigtem Areal.

In der Immunhistochemie konnte eine ausgeprägtere chondrozytäre AQP1-Expression in der oberen Zone (Tangentialzone; orientierend s. **Abb. 4**) des stärker geschädigten Knorpelareals im Vergleich zu einem weniger geschädigten Bereich nachgewiesen werden (**Abb. 12**). Dieses Ergebnis unterstreicht die in gleicher Weise erhobenen Befunde (Geyer et al., 2009; Hagiwara et al., 2013).

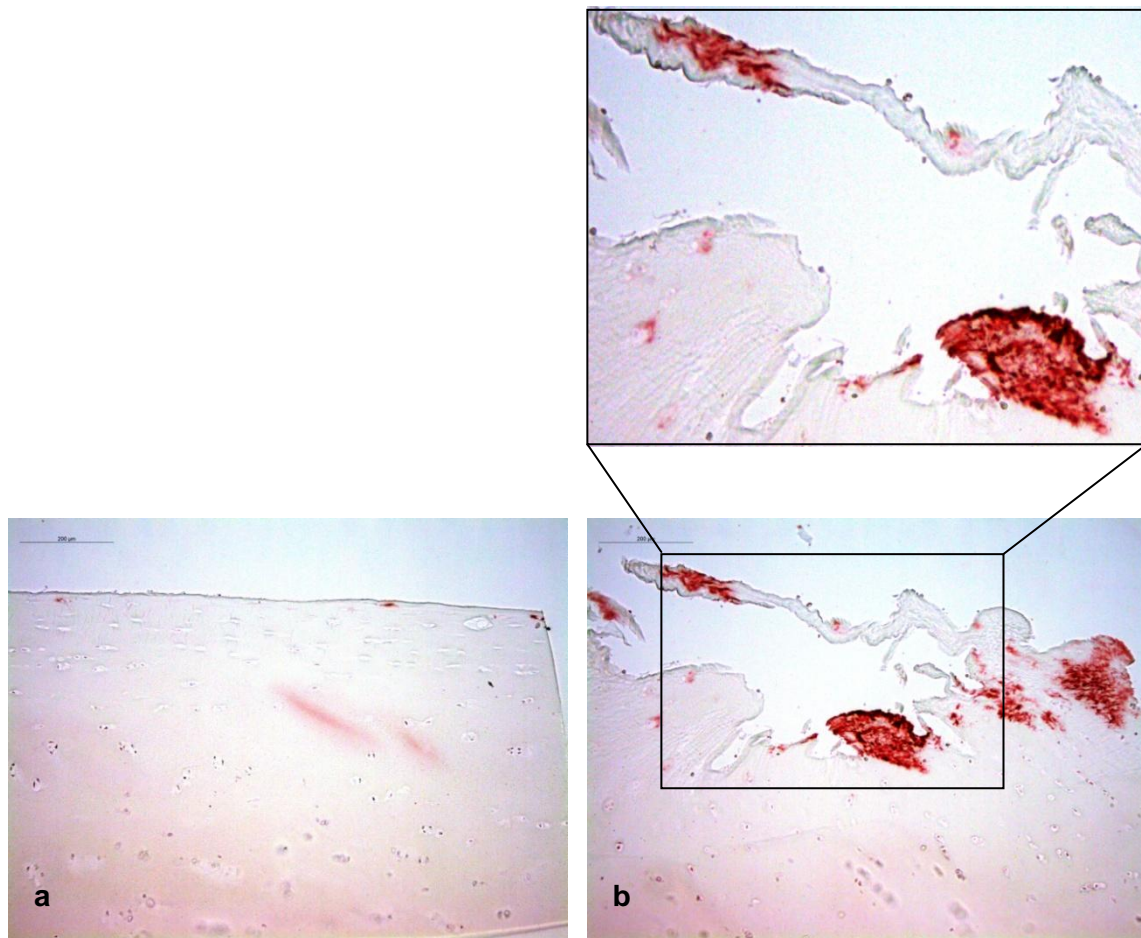


Abb. 12: Immunhistochemische Färbung gegen AQP1 (rot) des in **Abb. 11** dargestellten Operationsresektates (Vergr. 10x) **a** Geringe Signalausprägung von AQP1 im Gesamtpräparat. **b** Starke AQP1-Expression in der Tangentialzone mit Ausschnittsvergrößerung.

4.1.2 Periostin

In den gegen Periostin gefärbten Präparaten zeigte sich eine eher gleichbleibende Signalfrequenz bzw. eine Tendenz zu deren Abnahme in den stärker geschädigten Knorpelarealen (**Abb. 13**).

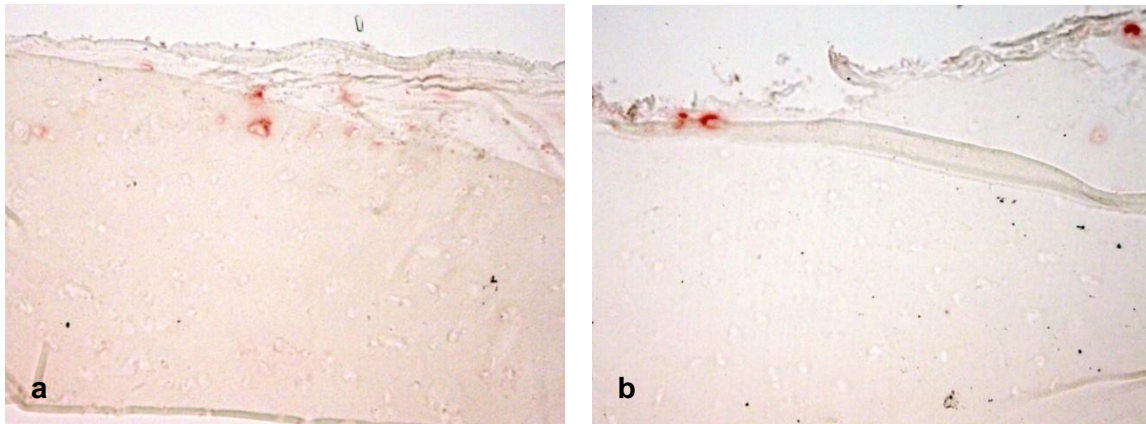


Abb. 13: Immunhistologische Färbungen gegen Periostin. Die in horizontaler Reihe einander gegenüber gestellten Präparate entstammen einem Operationsresektat (Vergr. 10x). **a** Makroskopisch gering geschädigtes Areal. **b** Makroskopisch stark geschädigter Bereich.

4.2 Analyse des Knockdowns von Aquaporin 1

Der Transfektions- bzw. Nukleofektionserfolg sollte auf Proteinebene in der Immunzytologie sowie im Western Blot und auf RNA-Ebene in der qRT-PCR erbracht werden. Die qRT-PCR diene desweiteren der Analyse des AQP1-Knockdowns bzgl. seiner quantitativen Auswirkungen auf die Expression verschiedener Gene der EZM.

4.2.1 Der Knockdown in der Immunzytologie

Am ersten Tag nach der Nukleofektion zeigte die immunzytologische Färbung der Chondrozyten eine deutliche Signalverminderung in den mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierten Zellen. Die als Kontrolle mit AllStars Negative Control siRNA transfizierten Chondrozyten derselben Population exprimierten im Vergleich sichtbar mehr AQP1 (**Abb. 14**). Der Erfolg der Nukleofektion und somit des Knockdowns des für AQP1 codierenden Gens waren visuell nachvollziehbar.

1. Tag nach Nukleofektion

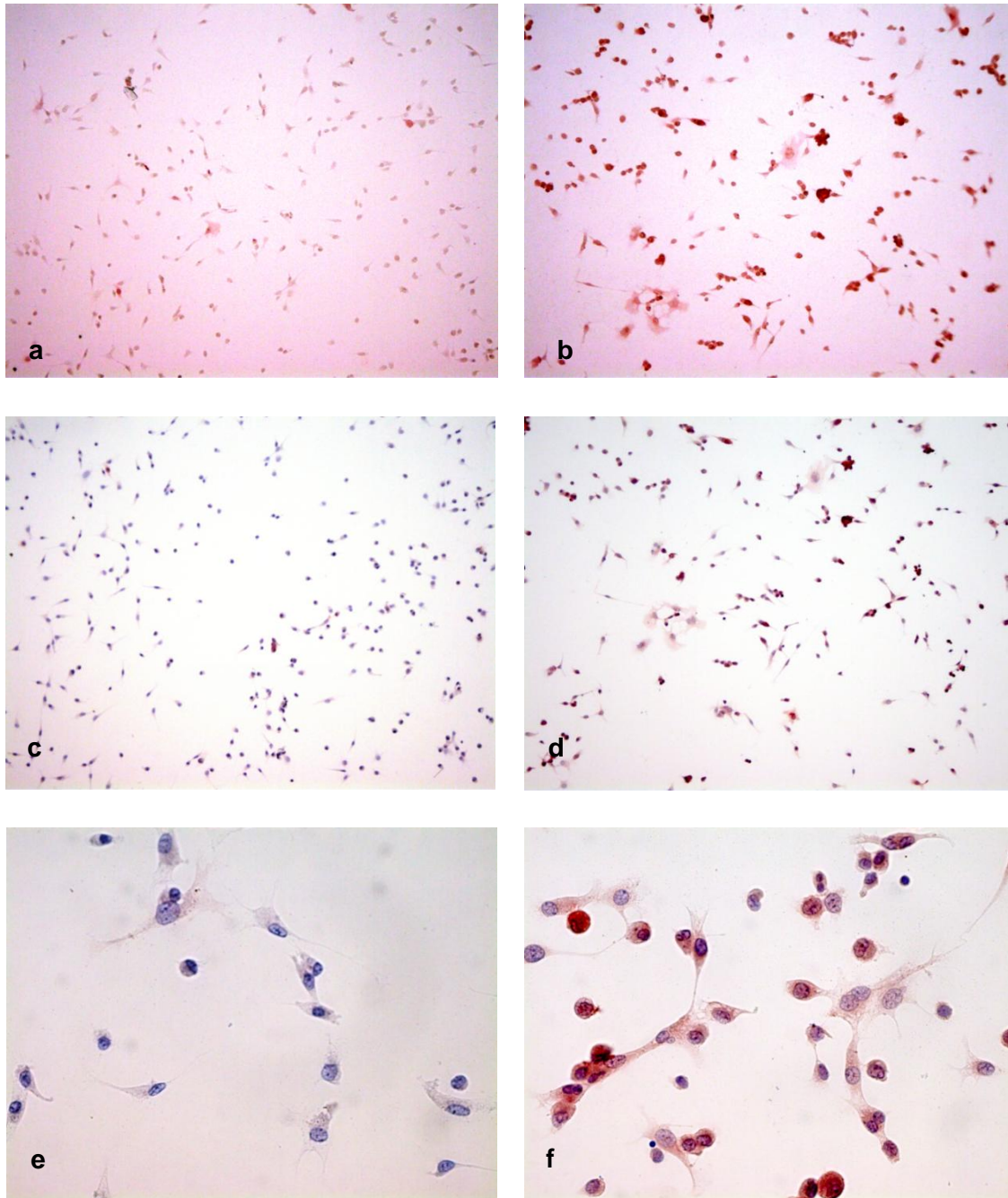
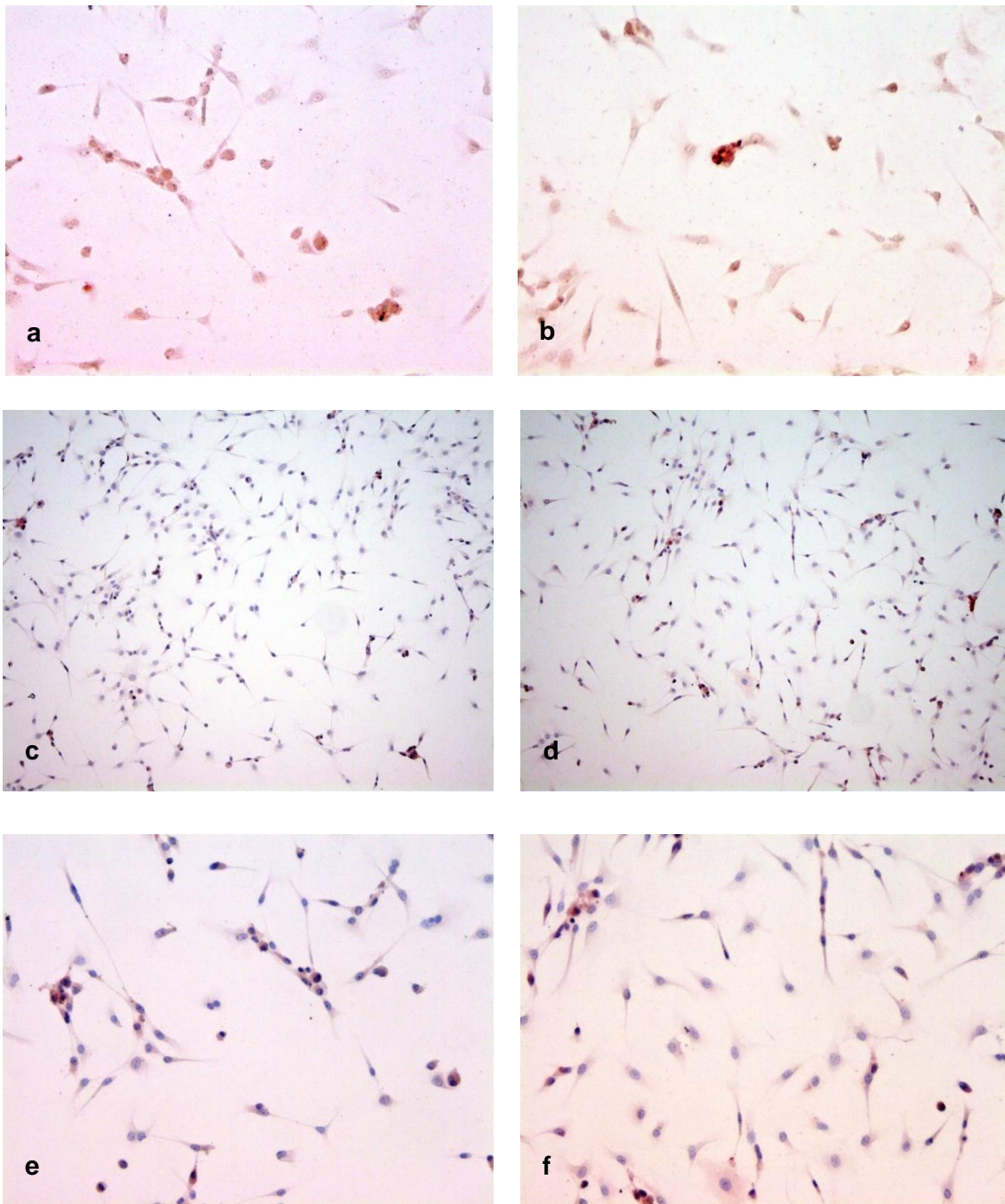


Abb. 14: Immunzytologische Färbung der Chondrozyten auf AQP1 einen Tag nach der Nukleofektion. **a, c, e** Mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierte Zellen. **b, d, f** Zugeordnete Kontrollen: Mit AllStars Negative Control siRNA nukleofizierte Zellen. **a, b** Nach AEC-Färbung. **c, d, e, f** Nach Hämalan-Gegenfärbung. (Vergr. **a, b, c, d** 10x, **e, f** 40x).

Die folgenden immunzytologischen Färbungen, Tag 3 bis 7 nach der Nukleofektion, zeigten grundsätzlich ein Angleichen der Signalintensitäten im zeitlichen Verlauf (**Abb. 15 u. 16**). Allerdings kam es in den mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierten Zellen am dritten Tag zunächst noch kurzzeitig zu einer Anhebung der Signalstärke, passend zum Mechanismus einer transienten Transfektion (3.1.6) während die Signalstärke in den zugeordneten Kontrollen stetig abnahm.

3. Tag nach Nukleofektion



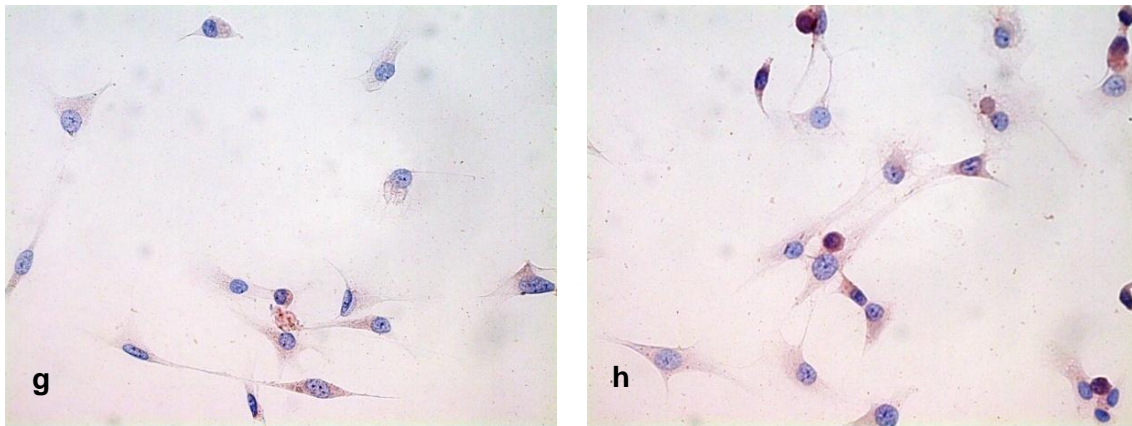
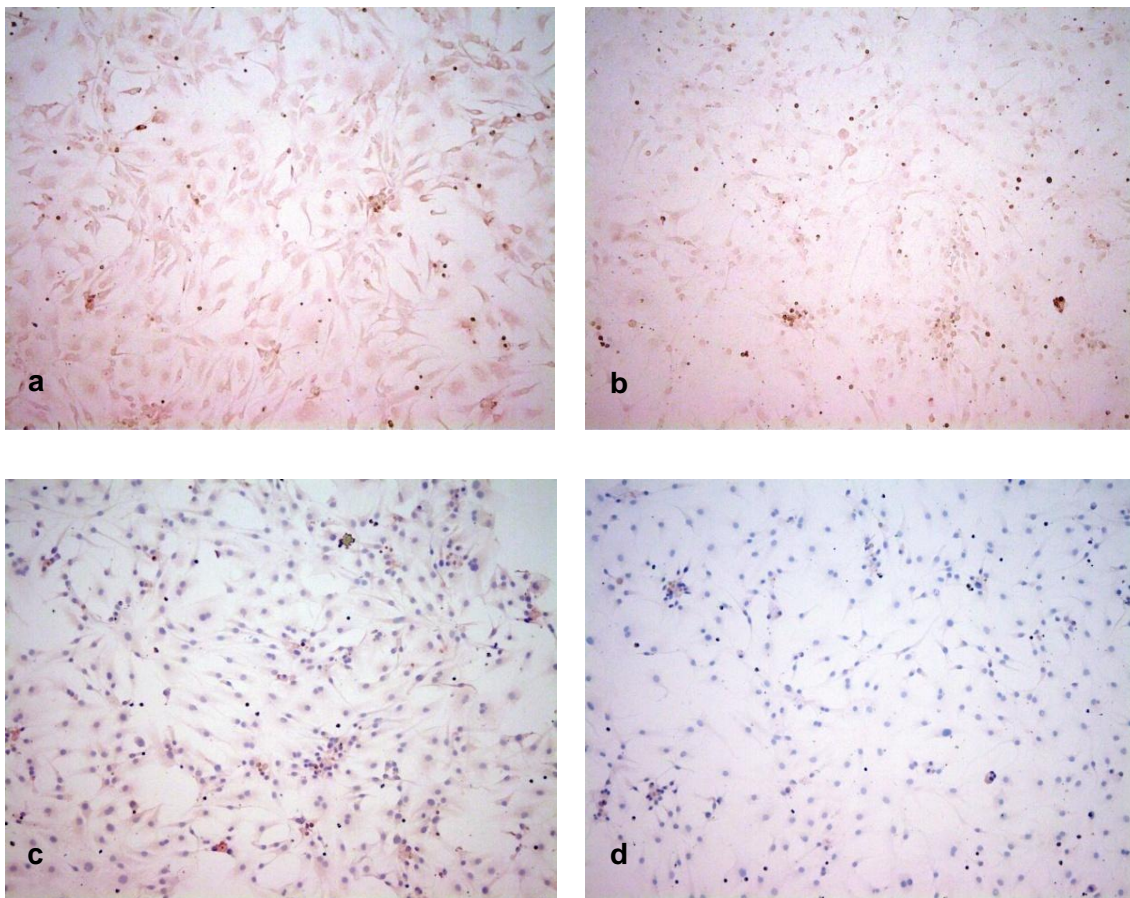


Abb. 15: Immunzytochemische Färbung gegen AQP1 am dritten Tag nach der Nukleofektion. **a, c, e, g** Mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierte Zellen. **b, d, f, h** Zugeordnete Kontrollen: Mit AllStars Negative Control siRNA nukleofizierte Zellen. **a, b** Nach AEC-Färbung. **c, d, e, f, g, h** Nach Hämalaun-Gegenfärbung. (Vergr. **a, b, e, f** 20x, **c, d** 10x, **g, h** 40x).

7. Tag nach Nukleofektion



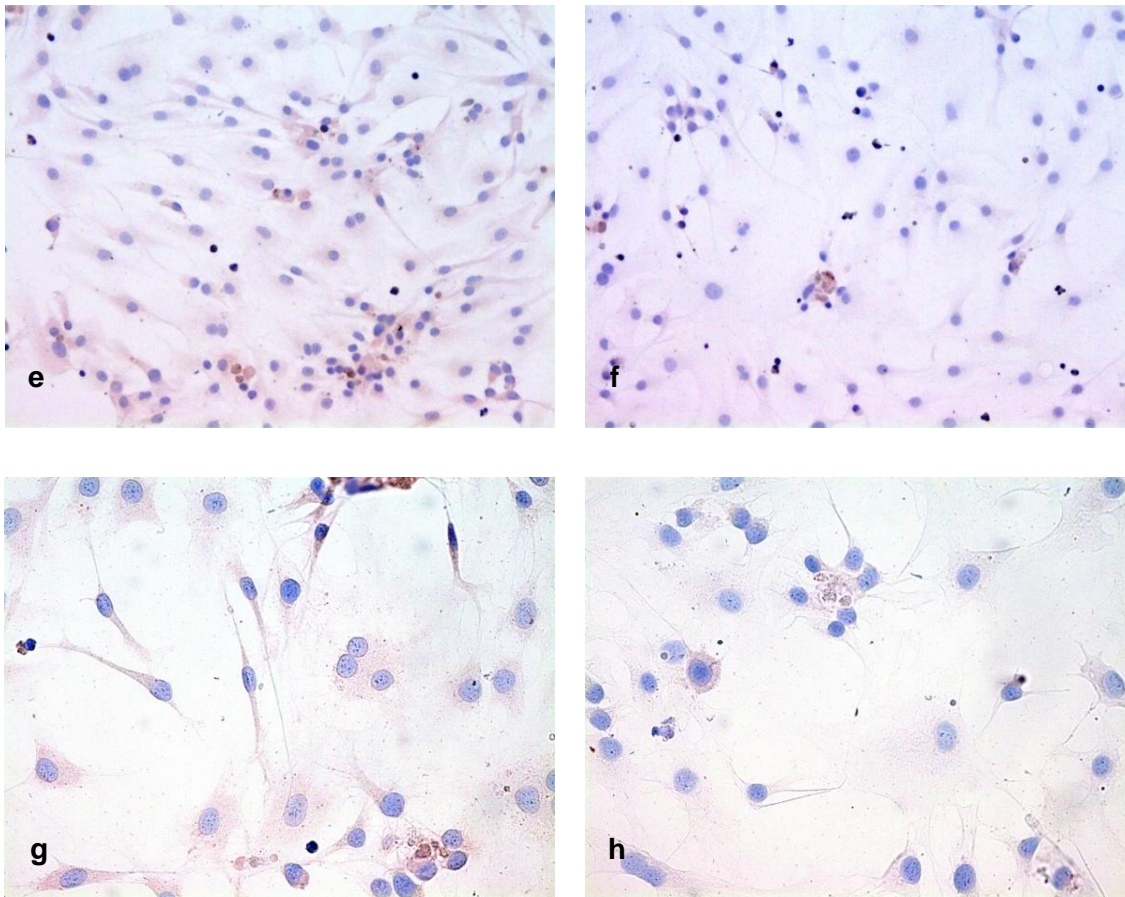


Abb. 16: Immunzytochemische Färbung gegen AQP1 am siebten Tag nach Nukleofektion. **a, c, e, g** Mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierte Zellen. **b, d, f, h** Zugeordnete Kontrollen: Mit AllStars Negative Control siRNA nukleofizierte Zellen. **a, b** Nach AEC-Färbung. **c, d, e, f, g, h** Nach Hämalaun-Gegenfärbung. (Vergr. **a, e, f** 20x, **b, c, d** 10x, **g, h** 40x).

4.2.2 Western Blot-Analyse

Im Western Blot wurden Proteinlysate von Chondrozyten derselben Zellpopulation untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate gewonnen, zum einen aus Chondrozyten zwei Tage nach deren Nukleofektion, zum anderen aus Chondrozyten, die nicht nukleofiziert und zwischenzeitlich weiter kultiviert worden waren. Die Proteinmenge der einzelnen auf das SDS-Gel aufgetragenen Lysatproben betrug jeweils 15 µg. Die Proteinbande für AQP1 wurde aufgrund der Angaben des Antikörper-Herstellers bei ca. 32,2 kDa erwartet. Für das angegebene Molekulargewicht gelang im Western Blot nach 1 min. Belichtungszeit für keine der untersuchten Proben ein Proteinnachweis. Lediglich für die mitgeführte Positivkontrolle (murines Nierengewebe, Proteinmenge = 20 µg) konnte eine Proteinbande bei ca. 70 kDa visualisiert werden (**Abb. 17**).

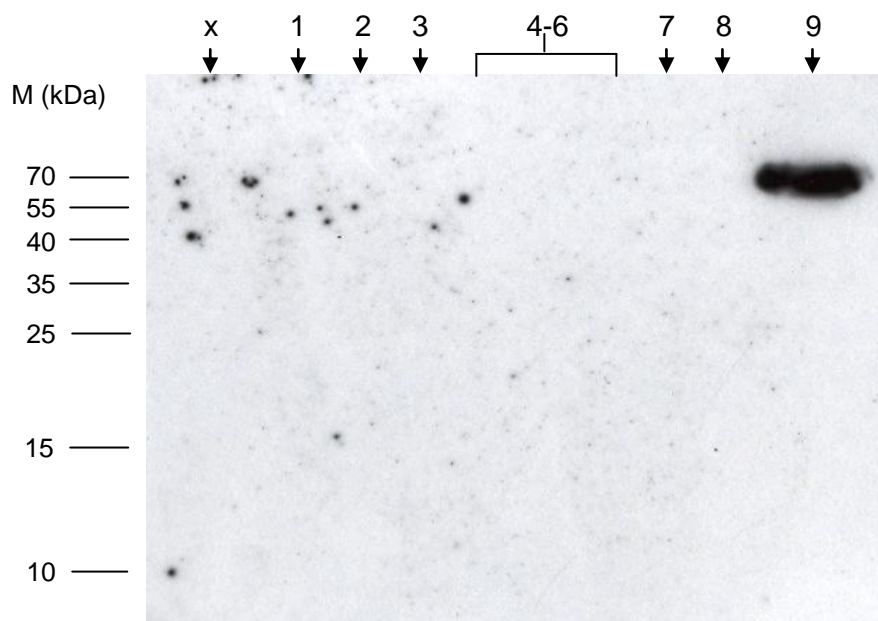


Abb. 17: AQP1-Nachweis im Western Blot nach 1 min. Belichtungszeit. x Bande = Protein-Leiter peqGOLD Protein Marker IV (**Tab. 2**); Probenlaufnummerierung: 1 = nicht nukleofizierte Chondrozyten, 2 = mit siRNA gegen AQP1 nukleofizierte Chondrozyten, 3 = mit AllStars Negative Control siRNA nukleofizierte Chondrozyten, 4-6 = mitgeführte Proben eines anderen Experimentes, 7 = erneute Markerauftragung (s. x-Bande), 8 = freie Geltasche, 9 = murines Nierengewebe.

Es wurde eine Reihe von Belichtungsversuchen in unterschiedlich großen zeitlichen Abständen durchgeführt. Nach ca. 7 min. konnte für das murine Nierengewebe eine weitere schwächer ausgeprägte Bande in Höhe des ursprünglich für AQP1 erwarteten Molekulargewichtes (ca. 32,2 kDa) zur Darstellung gebracht werden (**Abb. 18**).

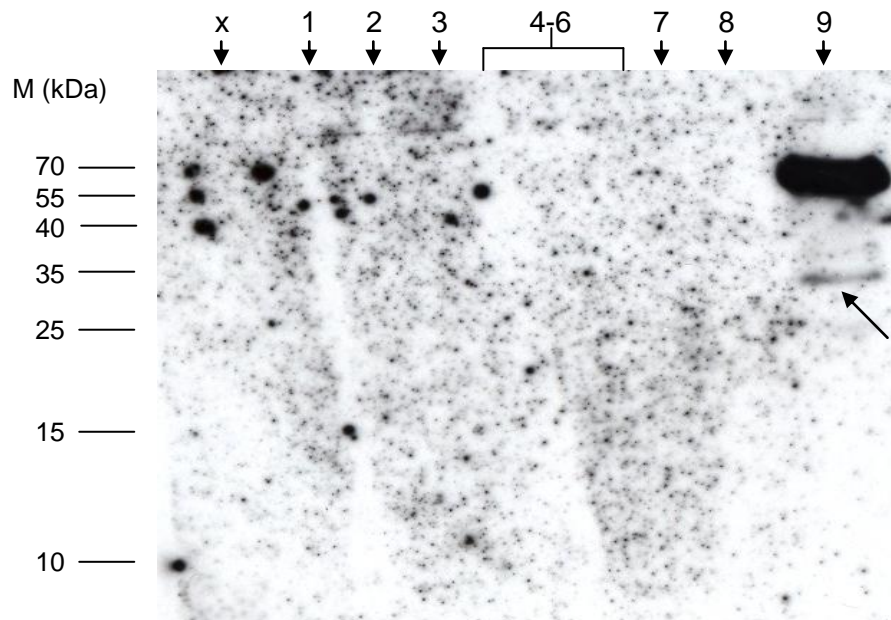


Abb. 18: AQP1-Nachweis im Western Blot nach 7 min. Belichtungszeit. Zur Probenlaufnummerierung s. **Abb. 17.**; Pfeilmarkierung: Weitere Proteinbande für das Gewebe murinen Ursprungs. Die Bandenhöhe liegt im vom Hersteller des verwendeten AQP1-Antikörpers angegebenen Bereich.

Die Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des zugehörigen SDS-Polyacrylamidgels konnte zeigen, dass eine Proteinübertragung von dem Gel auf die PVDF-Membran in der Transferkammer stattgefunden hatte. Vor allem der Transfer in der für die Darstellung des AQP1-Proteins notwendigen Größenordnung (25-35 kDa) war anhand des eingefärbten Gels gut nach zu vollziehen (**Abb. 19**).

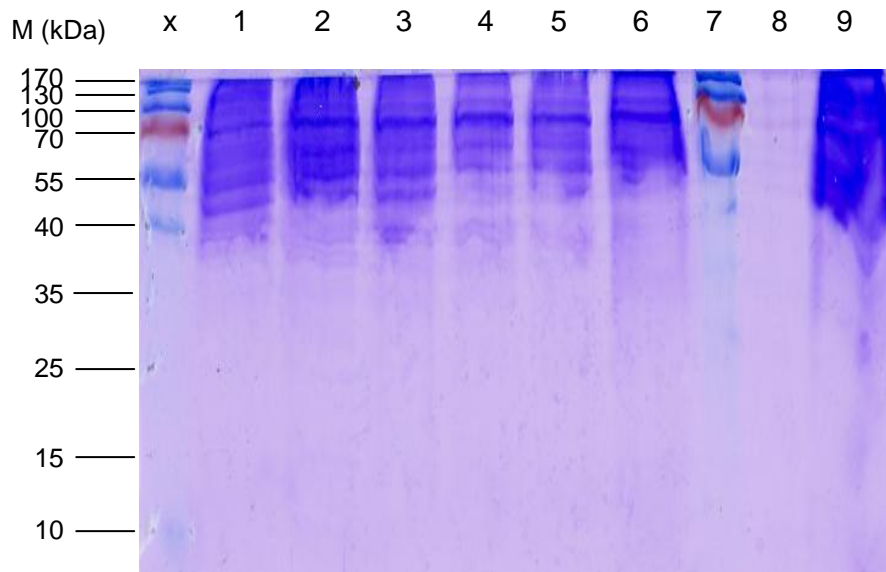


Abb. 19: Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran. Zur Probenlaufnummerierung s. **Abb. 17**.

Die als Ladekontrolle durchgeführte Antikörperdetektion mit Cyclophilin B (21 kDa) war ebenfalls erfolgreich. Die Proteinbanden konnten dargestellt werden und zeigten visuell eine annähernd gleichmäßige Beladung der Gelbahnen für die Proben 1, 2, 3 u. 9.

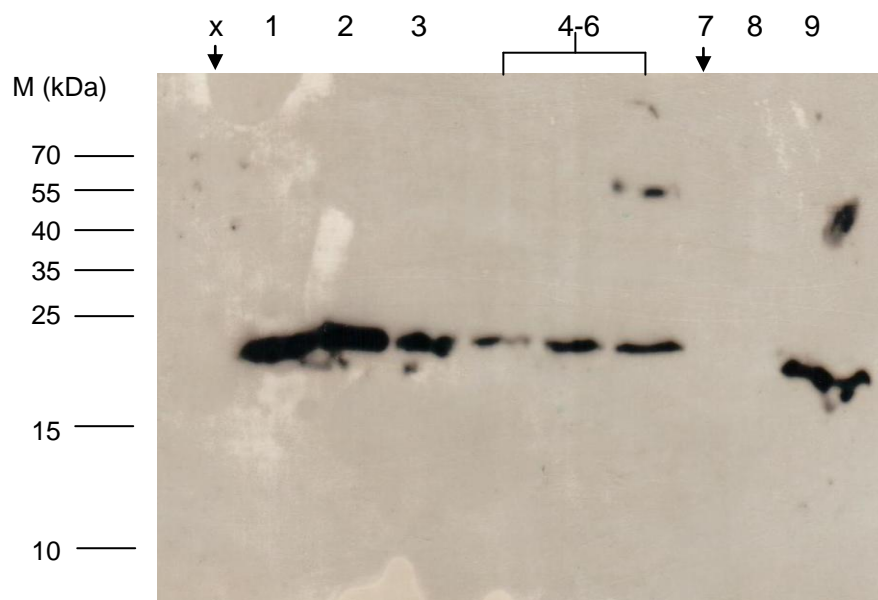


Abb. 20: Ladekontrolle mit Cyclophilin B im Western Blot. Zur Probenlaufnummerierung s. **Abb. 17**.

Die Ergebniskonstellation des Western Blots legt nahe, dass die eingesetzte Proteinmenge für den Nachweis von AQP1 zu gering war.

4.2.3 Der Knockdown von Aquaporin 1 in der qRT-PCR und seine Auswirkungen auf die Expression ausgewählter chondrozytärer Stoffwechselfparameter

Am 2. bis 3. Tag nach der Nukleofektion wurde die RNA aus den Chondrozyten isoliert. Nach anschließender cDNA-Gewinnung in der reversen Transkription erfolgte die relative Quantifizierung in der Real-Time PCR. Die für AQP1 ermittelten Werte (Mittelwert = 0,24) zeigten eine signifikante Reduzierung der Genexpression um 76 % gegenüber dem vorgegebenen Regulationsfaktor (RF=1), der durch das Programm der qRT-PCR als Referenz definiert war ($p < 0,001$). Der AQP1-Knockdown auf RNA-Ebene war also erfolgreich (**Abb. 21**).

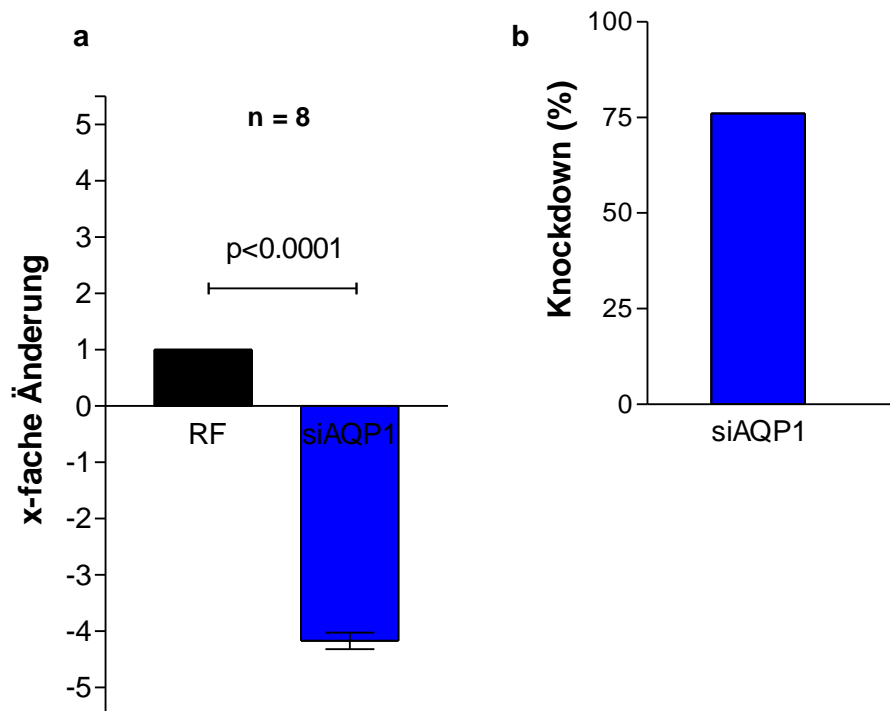


Abb. 21: AQP1-Knockdown nach relativer Quantifizierung in der RT-PCR. **a:** Darstellung als x-fache Änderung gegen den Regulationsfaktor (RF); **b:** prozentuale Darstellung. (n: Patientenzahl).

Für die im Zuge des AQP1-Knockdowns erhobenen Stoffwechselfparameter ergaben sich aufgrund der zu stark ausgeprägten Standardabweichungen keine statistisch signifikanten Veränderungen in ihrer Expression (**Abb. 22**).

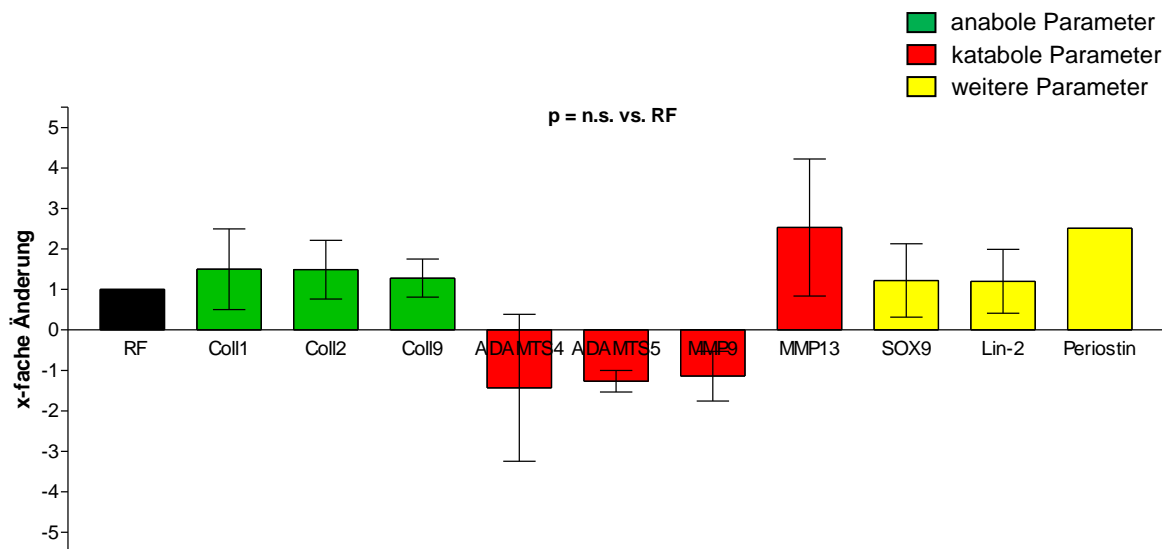


Abb. 22: Regulation verschiedener chondrozytärer Stoffwechselfparameter infolge des AQP1-Knockdowns. Coll1 n = 8; Coll2 n = 8; Coll9 n = 5; ADAMTS4 n = 3; ADAMTS5 n = 7; MMP9 n = 8; MMP13 n = 4; SOX9 n = 5; Lin-2 n = 6; Periostin n = 1. (n: Patientenzahl; Coll: Kollagen Typ, RF: Regulationsfaktor).

Nach dem erfolgreichen Knockdown von AQP1 wurden im zeitlichen Verlauf nach und nach weitere Parameter in der qRT-PCR untersucht, um mögliche sekundäre zelluläre Auswirkungen des AQP1-Knockdowns aufzuzeigen. Die unterschiedlichen Patientenzahlen für die aufgeführten Einzelparameter resultieren zum Teil aus zu geringer Menge an untersuchbarem Spendergewebe. Es lag bei maximal acht Patienten ausreichend Knorpelgewebe vor. Ein weiterer Grund war die Varianz in der cDNA-Gewinnung aus den verwendeten Gewebeproben, die durch die individuellen Eigenschaften der verschiedenen Spenderproben bestimmt wurde.

4.3 Überexpression von Aquaporin 1

Parallel zu den Untersuchungen zum Knockdown von AQP1 wurde versucht, ein System für dessen Überexpression zu etablieren. Hierzu musste zunächst das AQP1-Fragment mittels PCR amplifiziert und danach in einen Vektor (Plasmid) transformiert werden. Dieser kann dann wiederum zur Vervielfältigung in ein Expressionssystem (*E. coli*) eingeschleust werden. Ist die Vervielfältigung (Klonierung) gelungen, können die Chondrozyten mit dem Plasmid mittels Elektroporation transfiziert werden. Die transfizierten Zellen erhalten so die Möglichkeit, vermehrt AQP1-Kanäle auszubilden. Anschließend kann das Transfektionsergebnis mit Hilfe der bereits im Zusammenhang mit dem Knockdown dargestellten Methoden (Immunzytologie, qRT-PCR, Western Blot) auf verschiedenen Ebenen analysiert werden.

Darüber hinaus ermöglicht die erfolgreiche Klonierung eines DNA-Fragments mit Hilfe eines Vektors die Vermehrung der DNA in großer Zahl. Diese hohen DNA-Mengen können für die Durchführung weiterer Experimente genutzt werden. Zudem zeichnet sich die auf diese Art und Weise gewonnene DNA durch hohe Stabilität und einen unkomplizierten Umgang aus. Ist es gelungen, einen Klon zu generieren, kann dieser immer wieder vervielfältigt werden.

4.3.1 Amplifizierung von Aquaporin 1 in der PCR

Nach der RNA-Isolierung aus kultivierten Chondrozyten und dem anschließenden Umschreiben der RNA in cDNA mittels reverser Transkription, wurde versucht das AQP1-Fragment in der PCR zu generieren. Um die spätere Klonierung des Fragments in einen Expressionsvektor zu ermöglichen, wurden Primer mit künstlichen Schnittstellen sowie Start- und Stop-Codons designt. Es wurden Schnittstellen für die Enzyme *NcoI* und *NotI* in die Primer AQP1-LB42 (for) und AQP1-LB43 (rev) (**Abb. 23**) eingefügt, da der für die Klonierung vorgesehene Vektor über entsprechende Schnittstellen verfügt. Die in **Abb. 23** markierte Kozak-Sequenz bezeichnet eine häufig in unmittelbarer Nähe des Startcodons vorkommende Basenfolge in mRNA eukaryotischer Zellen. Die Kozak-Sequenz wird von den Ribosomen erkannt und ist für den Start der Translation und somit letztlich für die Proteinbiosynthese bedeutsam.

AQP1-LB42 (for) 5`-AAA CCA TGG GCC ACC ATG GCC AGC GAG-3`

NcoI Kozak Start

AQP1-LB43 (rev) 5`-TTT GCG GCC GCC TAT TTG GGC TTC ATC TCC-3`

| | | | | | | | | |

Komplementär: 5`-AAA CGC CGG CGG ATA AAC CCG AAG TAG AGG-3`

NotI Stopp

Abb. 23 Darstellung der Primer für die Amplifizierung von AQP1 in der PCR. Schnittstellen für *NcoI*: grün; Schnittstelle für *NotI*: blau

Nach Testung verschiedener cDNA-Konzentrationen zur Verwendung in der PCR und Optimierung der Thermocycler-Bedingungen (Temperatur-, Zeiteinstellungen), erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der gewonnenen DNA-Fragmente. Das DNA-Fragment aus der dem AQP1 größenentsprechenden Bande (ca. 810 bp) wurde der Sequenzierung zugeführt (**Abb. 24**).

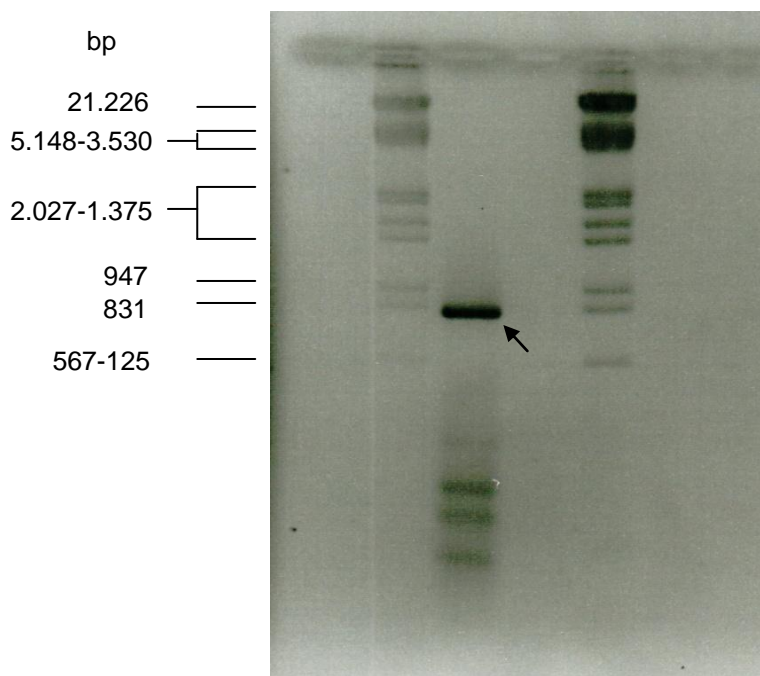


Abb. 24: Analyse des PCR-Amplifikats nach Auftrennung in der Gelelektrophorese (Agarosegel 1,5 %). Links und rechts des mit dem Pfeil markierten Amplifikats: DNA-Leiter Lambda DNA/*Eco*RI und *Hin*II Marker (**Tab. 2**)

4.3.2 Sequenzierung des PCR-Produktes

Nach Isolierung und Aufreinigung des 810 bp großen Amplifikats aus dem Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit (50) erfolgte dessen weitestgehende Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech. Das Sequenzierungsergebnis (**Abb. 25**) verifizierte das gewonnene Fragment als AQP1 ohne Mutationen.

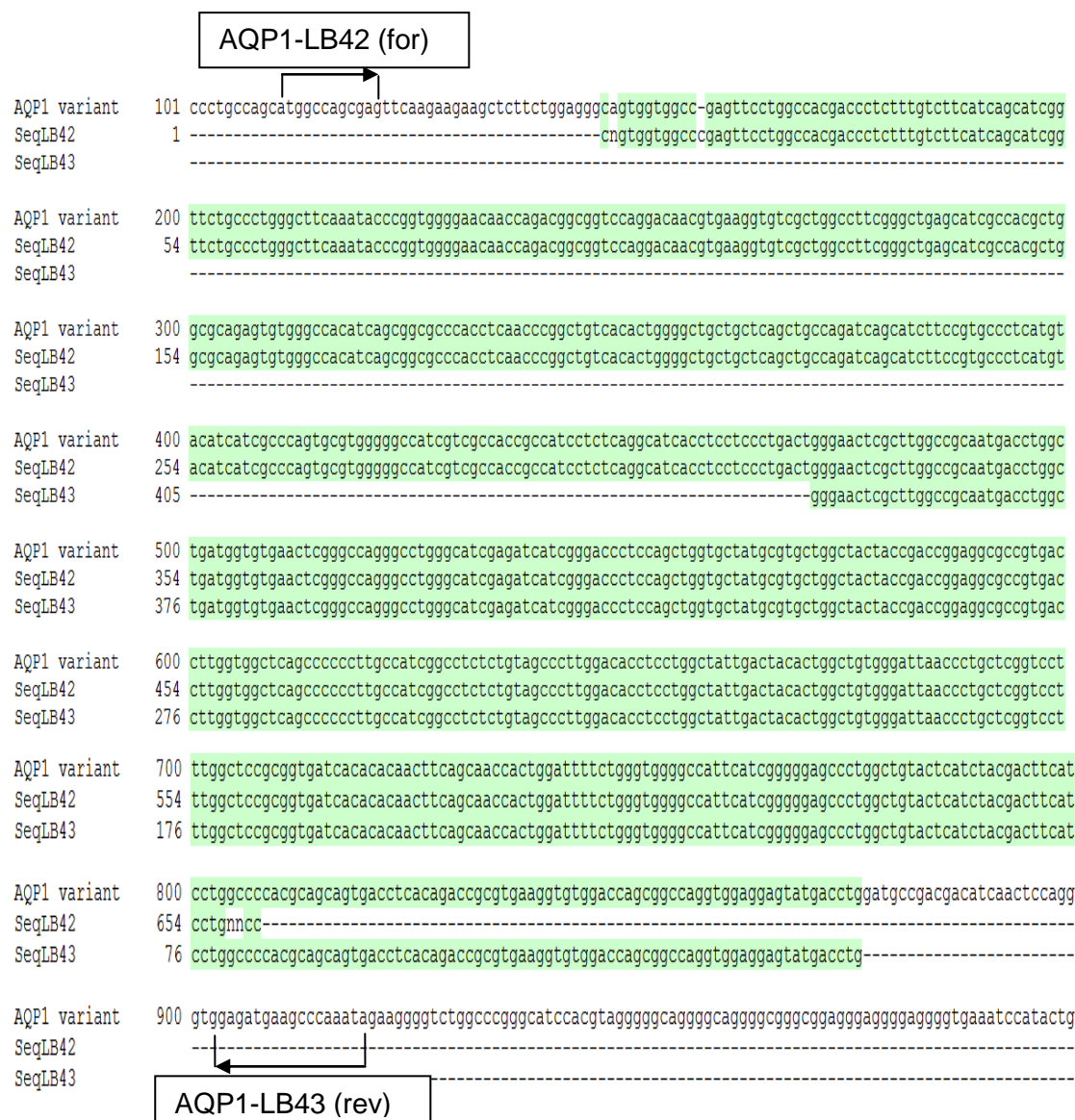


Abb. 25: Sequenzierungsergebnis des PCR-Amplifikats mit den Primern AQP1-LB42 (for) und AQP1-LB43 (rev). Grüne Markierung: AQP1-Fragment.

4.3.3 Klonierungsverlauf mit verschiedenen Vektoren

Nach erfolgreicher Amplifikation des AQP1-Fragmentes in der PCR konnte versucht werden, das Fragment über die Zwischenschritte der Restriktion und Ligation in *E. coli*-Bakterien zu transformieren.

4.3.3.1 Klonierungsversuch mit dem pQE-TriSystem

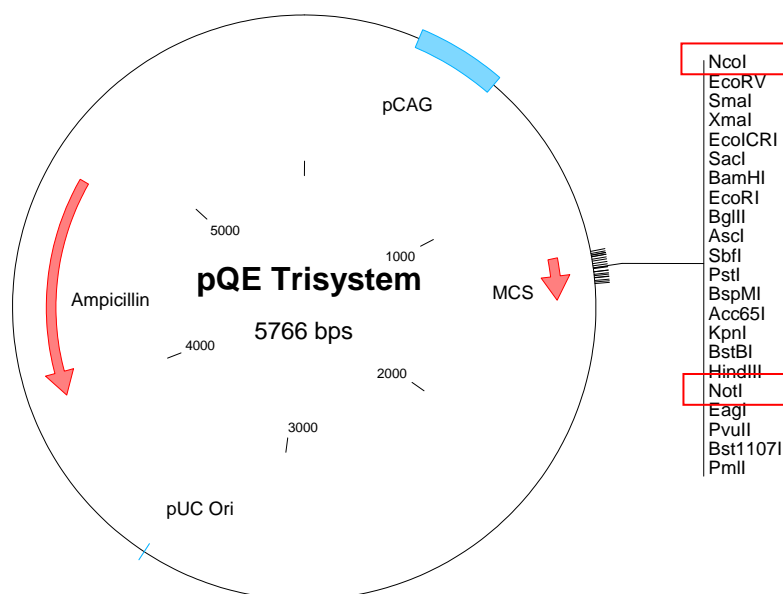


Abb. 26: Vektorkarte des pQE-TriSystems mit Markierung der verwendeten Schnittstellen.

Die initialen Klonierungsversuche erfolgten mit dem pQE-TriSystem, da dieses System innerhalb der Forschungsgruppe bereits etabliert war. Die in der PCR gewonnenen AQP1-Fragmente und der pQE-Vektor, der über die passenden Schnittstellen verfügt, wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NotI*-HF™ und *NcoI*-HF™ geschnitten. Die verwendeten Enzyme erzeugen sog. klebrige Enden (sticky ends), über die anschließend die Ligation von Vektor und DNA ermöglicht wird. Anschließend erfolgte die Transformation des Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien

(Stamm DH5 α). Die Ausplattierung der transformierten Bakterien wurde auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten vorgenommen, da der pQE-Vektor die entsprechende Resistenz als Selektionsmarker trägt. Allerdings konnte nach Transformation mit dem Ligationsansatz keine Resistenz erzeugt und kein Wachstum nachgewiesen werden. Auch nach Testung verschiedener Konzentrationen und Verhältnisse der variablen Reagenzien in den Ansätzen für die Restriktion (0,5-1,0 μ g DNA), die Ligation (molares Verhältnis von Vektor zu DNA 1:3, 1:5, 1:10) und die Transformation (1-10 μ l Plasmid-DNA) zeigten die Transformationsversuche keinen Erfolg. Die Kontrolle des Restriktionsansatzes durch Auftragung auf ein 1,5 % Agarosegel verdeutlichte, dass die Restriktionsendonukleasen den Vektor korrekt schnitten (**Abb. 27**). Die bei der Transformation mitgeführten Kontrollen demonstrierten, dass die Transformation des pQE-Vektors ohne DNA-Insert in die *E. coli*-Bakterien gelungen war. Aus diesen Kontrollen ergab sich aber, dass die Ligation von AQP1-Fragment und Vektor fehlgeschlagen sein musste.

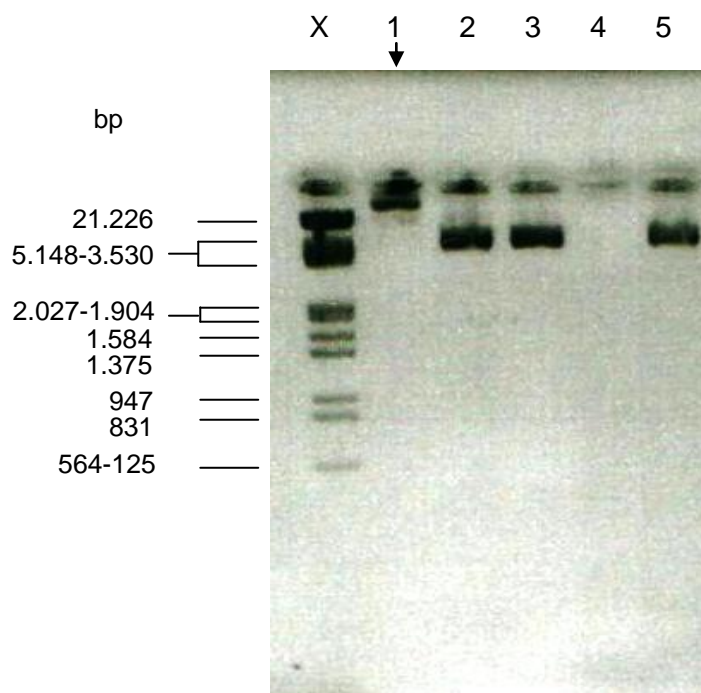
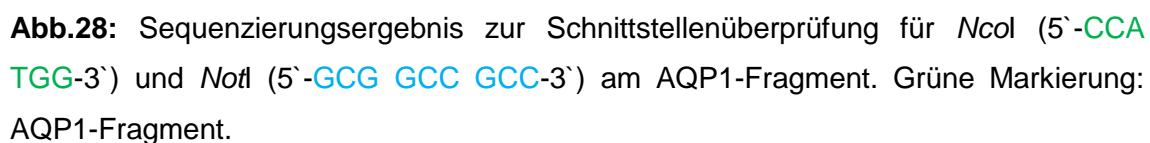


Abb. 27: Restriktionsanalyse des pQE-Vektors. x-Bande: DNA-Leiter (s. **Abb. 24**); Probenlaufnummerierung: 1 = ungeschnittener Vektor; 2 = Vektor geschnitten mit *NotI*; 3 = Vektor geschnitten mit *NcoI*; 4 = leere Geltasche; 5 = Vektor geschnitten mit *NotI* und *NcoI*.



4.3.3.2 Zwischenklonierung in pBlueScript KS II (+)

Am AQP1-Fragment konnten keine klebrigen Enden für die Ligation erzeugt werden. Eine weniger effektive Alternative stellt die Ligation mit glatten Enden (blunt ends) dar. Als Vektor für diese Option wurde im folgenden Ansatz pBlueScript KS II (+) gewählt.

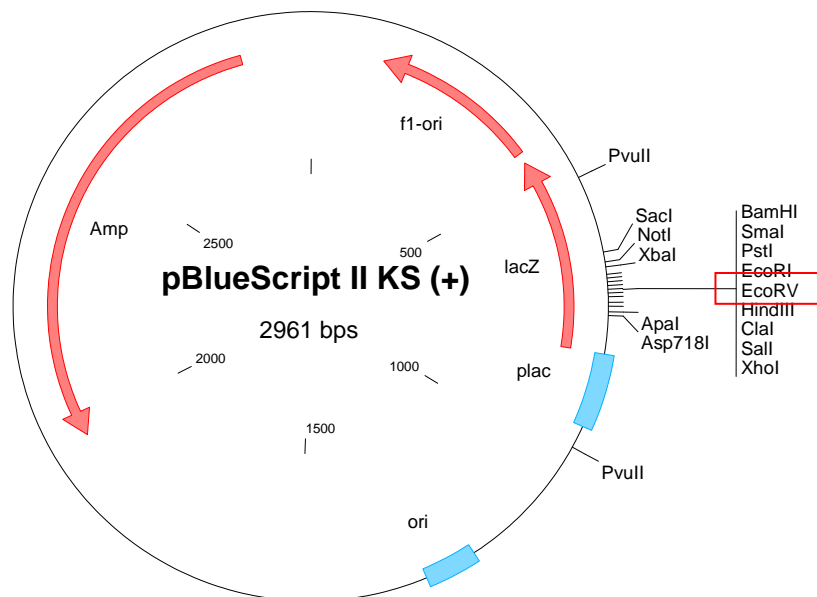


Abb. 29: Vektorkarte von pBlueScript KS II (+) mit Markierung der verwendeten Schnittstelle.

pBlueScript KS II (+) ist ein bekannter kommerziell erwerblicher Vektor zur vereinfachten Klonierung und Sequenzierung. Zusätzlich zur Ampicillin-Resistenz bietet er u. a. über die enthaltene lacZ-Gensequenz die Möglichkeit, im Rahmen eines Blau-Weiß-Screenings direkt die gelungene Ligation nachzuweisen (3.3.3). Dieser Vektor kann allerdings nicht in eukaryotische Zellen eingebracht werden, da er nicht über den hierzu nötigen spezifischen Promotor verfügt. Trotz seiner guten Vektoreigenschaften ist er damit lediglich als Zwischenvektor geeignet.

Der Vektor wurde zunächst mit der Restriktionsendonuklease *EcoRV* (**Tab. 10**) verdaut. Dem Restriktions- bzw. dem Ligationsansatz wurde alkalische Phosphatase zugegeben, um einer möglichen Autoligation des Vektors vorzubeugen. Erneut wurden in den Restriktions-, Ligations- und Transformationsansätzen verschiedene

Konzentrationen und Verhältnisse getestet (4.3.3.1). Die Transformationsansätze wurden auf ampicillinhaltige, für das Blau-Weiss-Screening mit IPTG und X-Gal (**Tab. 2**) präparierte LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Klonierungsversuche blieben erfolglos. Die analog zu den Klonierungsversuchen mit dem pQE-TriSystem durchgeführten Kontrollen zeigten die Funktionsfähigkeit aller Komponenten und angewandter Verfahren, bis auf die Ligation. Wieder war es zu keiner Verbindung von Fragment und Vektor gekommen. Eine mögliche Interferenz von IPTG und X-Gal wurde durch eine mitgeführte Kontrolle, LB-Agarplatte ohne entsprechende Präparation, ausgeschlossen.

4.3.3.3 TA-Klonierung mit dem pGEM®-T Easy Vector

Eine weitere Option ist die TA-Klonierung (3.4.7). Bei dieser Methode liegt der Vektor in linearisierter Form mit einem Thymidinnukleotid-Überhang am 3'Ende vor. Der Überhang ermöglicht den Einbau des Fragments nach dem Prinzip der sticky-end-Ligation, wenn das anzuhängende DNA-Fragment am 3'Ende über einen Adenosin-Überhang verfügt. Für die TA-Klonierung wurde als passendes Vektorsystem der pGEM®-T Easy Vektor gewählt. Das für die Ligation mit dem Vektor notwendige 3'Ende am DNA-Fragment kann bereits während der Amplifizierung in der PCR durch die Verwendung einer entsprechenden thermostabilen DNA-Polymerase erzeugt werden. Die zur Amplifizierung des AQP1-Fragments genutzte Phusion®High-Fidelity DNA Polymerase (**Tab. 10**) produziert glatte Enden. Sie wurde dennoch zur Generierung des AQP1-Fragments in der PCR genutzt, da sich ihr Gebrauch im Vergleich zu anderen Polymerasen als am effektivsten erwies. Durch eine Modifizierungsprozedur konnte die Adenylierung (A-tailing) des AQP1-Fragments im Anschluss an die PCR erfolgen. Die Adenylierung wurde nach den Angaben des Vektorherstellers unter Verwendung einer Taq DNA Polymerase (**Tab. 10**) durchgeführt. Nach der Adenylierung erfolgte die Ligation des modifizierten AQP1-Fragments mit dem pGEM®-T Easy Vektor.

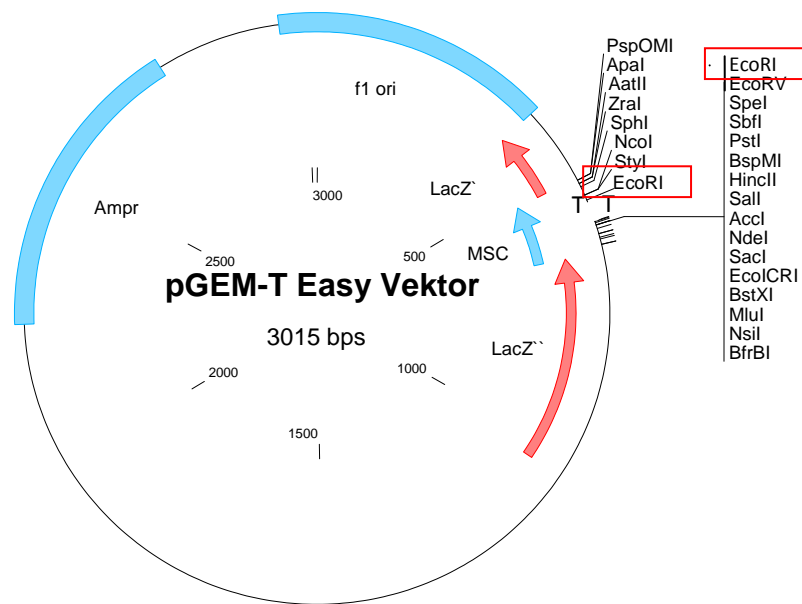


Abb. 30: Vektorkarte von pGEM[®]-T Easy.

Die Ligation wurde ebenfalls nach den Angaben des Vektorherstellers ausgeführt. Zur Optimierung der Ligationsbedingungen wurde die für die Ligation benötigte Menge des AQP1-Fragments wie folgt kalkuliert:

$$\frac{\text{Vektor (ng)} \times \text{DNA-Fragment (bp)} \times \text{Verhältnis DNA-Fragment : Vektor}}{\text{Vektor (bp)}} = \text{DNA-Fragment in ng}$$

Gewählt wurde ein 5:1 Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor. Das Ligationsprodukt wurde in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert und wiederum auf ampicillinhaltige, für die Durchführung des Blau-Weiss-Screenings präparierte, LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Es konnten unter Nutzung des Blau-Weiss-Screenings zur Selektion 30 Klone (weiß) von den LB-Agarplatten abgetragen werden. Das Abtragen möglichst vieler Klone ist notwendig, da bei dieser Technik eine Ligation des Inserts mit dem Vektor auch in umgekehrter Leserichtung möglich ist. Somit reduziert sich die Wahrscheinlichkeit auf 50 % der möglichen Expression des gewünschten Gens.



Abb.31: Blau-Weiss-Screening von transformierten *E. coli* DH5α. Pfeilmarkierung: weiße (erwünschte) Klone; Methode: TA-Klonierung; Vektor: pGEM®-T Easy; DNA-Fragment: AQP1; Medium: ampicillinhaltige LB-Agarplatte mit X-Gal und IPTG.

Es wurden 30 Flüssigkulturen (je 5 ml) angelegt und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmid-Minipräparation nach dem Prinzip der direkten Fällung (3.4.1). Nach Restriktion der gewonnen Plasmid-DNA mit *NotI*, wurden die 30 Proben auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt (**Abb. 32 a, b**).

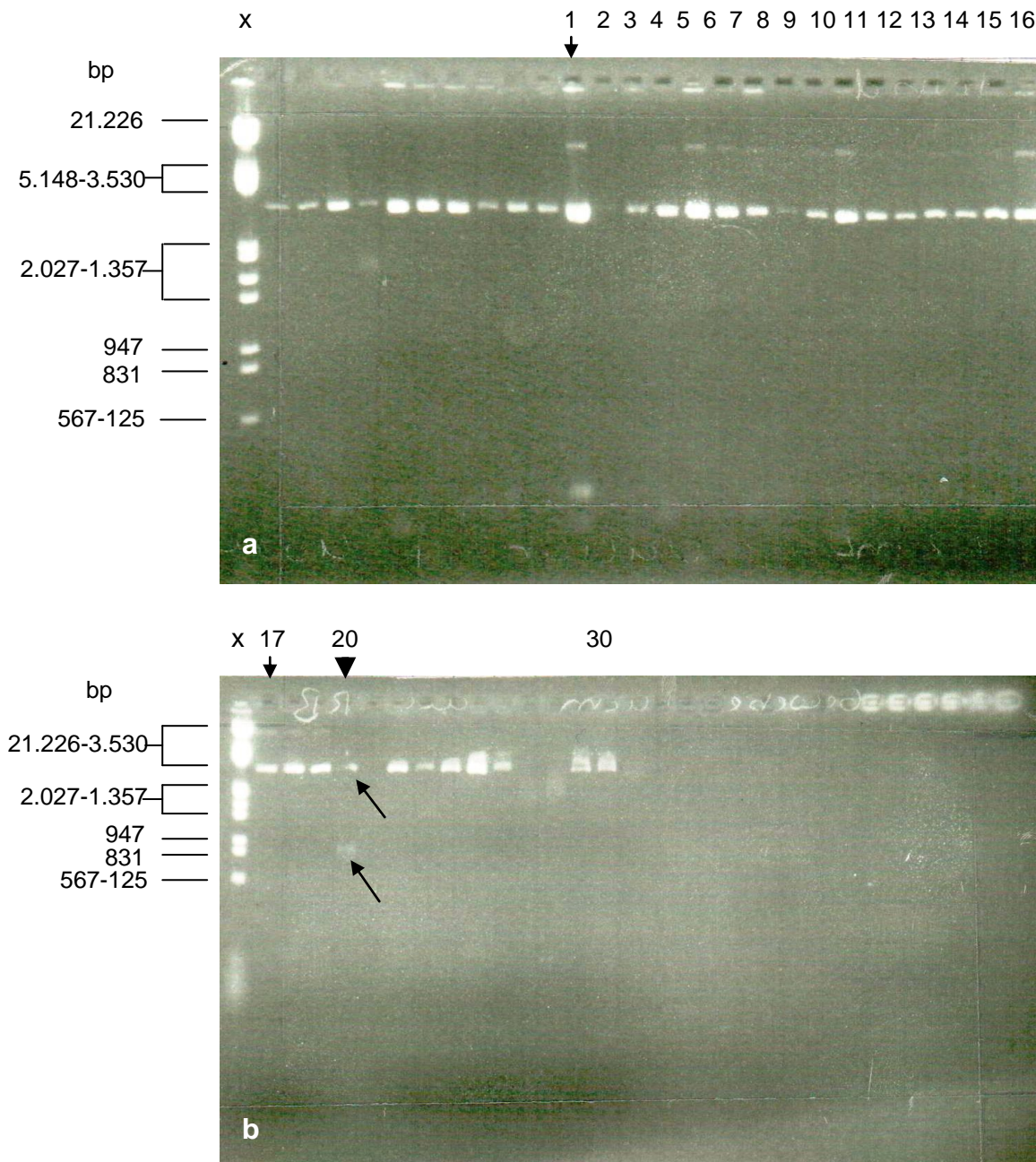


Abb. 32 a, b Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA. x-Bande: DNA-Leiter (s. **Abb. 24**); Nummerierung 1–30: Probenauftragung. Erläuterung: Die ersten 10 Banden in **Abb. 32 a** sind einem anderen Experiment zu zuordnen. **b** Pfeil oben: pGEM[®]-T Easy Vektor; Pfeil unten: generiertes Fragment.

Die **Abb. 32 b** zeigt bei Proben-Nummer 20 den linearisierten pGEM[®]-T Easy Vektor bei ca. 3000 bp (oberer Pfeil) und ein durch die Restriktion entstandenes zw. 831-947 bp großes Fragment (unterer Pfeil). Um ein deutlicheres Ergebnis zu erreichen, wurde die Plasmid-DNA dieses Klon in einer höheren Menge erneut einer

Restriktionsanalyse mit dem Enzym *EcoRI* unterzogen. Der pGEM®-T Easy Vektor verfügt hierzu über zwei geeignete Schnittstellen in Fragmentnähe. Die Auswertung in der Agarose-Gelelektrophorese bestätigte das zuvor erhaltene Ergebnis (**Abb. 33**).

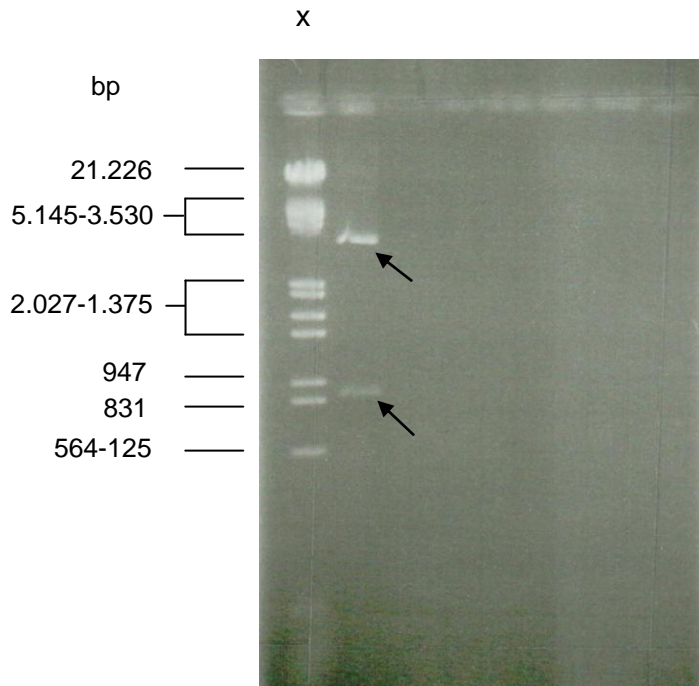


Abb. 33: Plasmid-DNA nach Restriktion mit *EcoRI* in 1,5 % Agarosegel. x-Bande: DNA-Leiter (s. **Abb. 24**); Pfeil oben: pGEM®-T Easy Vektor bei ca. 3000 bp; Pfeil unten: Generiertes Fragment.

Die Plasmid-DNA dieses Klon wurde noch einmal in *E. coli* vom Stamm DH5α transformiert und ausplattiert. Im Folgenden konnten zwei Klone von der LB-Agarplatte abgetragen werden, von denen jeweils 5 ml Übernachtskulturen angelegt wurden. Von den Übernachtskulturen wurden Dauerkulturen erstellt. Zudem wurde aus den Übernachtskulturen Material für die Plasmid-Isolierung (3.4.1) entnommen. Die Plasmid-Isolierung wurde mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit (**Tab. 5**) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der Plasmid-DNA durch die Firma GATC Biotech, mit den durch den Hersteller des pGEM®-T Easy Vektor empfohlenen Primern pUC/M13 (for) und pUC/M13 (rev) (**Tab. 12**). Die Sequenzierung erbrachte das gewünschte Ergebnis (**Abb. 34**). Das AQP1-Fragment war in den pGEM®-T Easy Vektor eingefügt worden und die Klonierung somit erfolgreich.

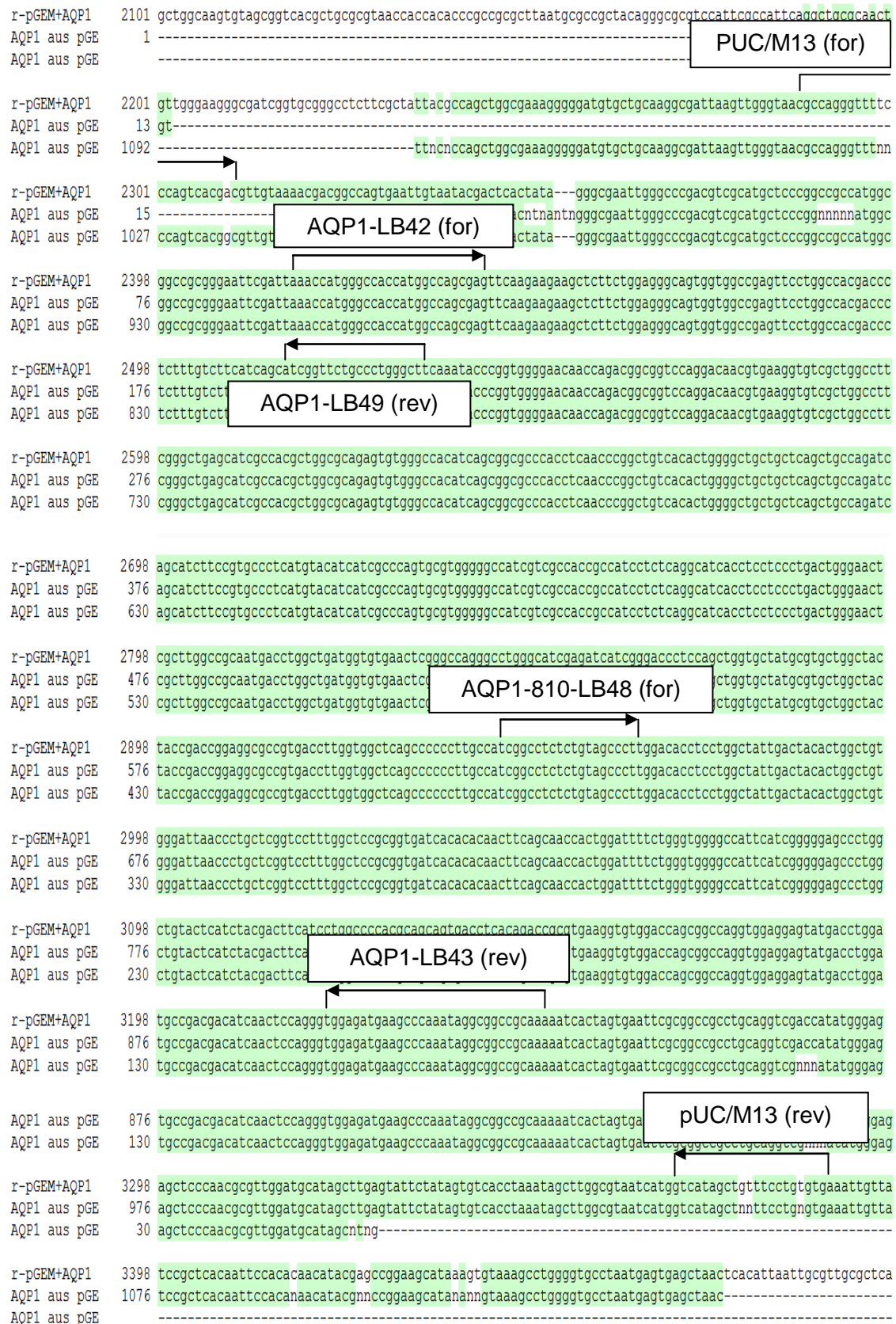


Abb. 34: Sequenzierungsergebnis der aus dem Vektor pGEM®-T Easy isolierten Plasmid-DNA. Grüne Markierung: AQP1-Fragment.

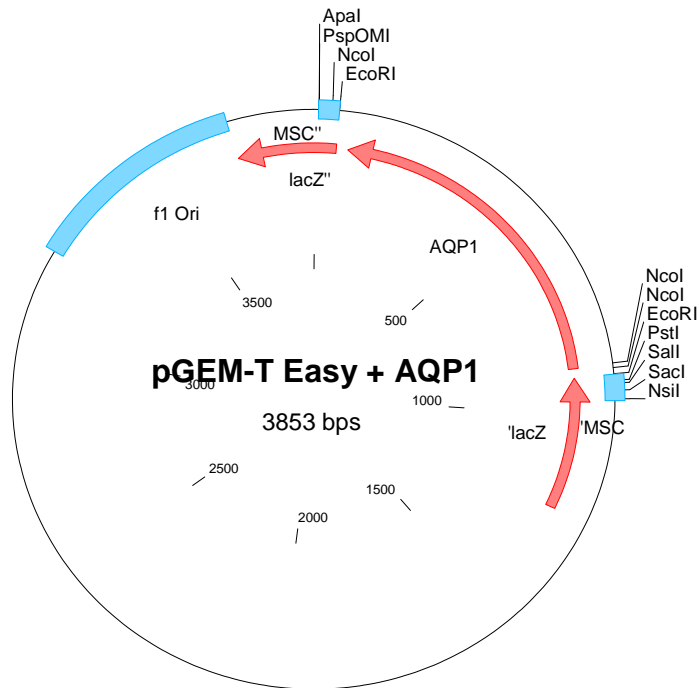


Abb. 35: Vektorkarte von pGEM[®]-T Easy ligiert mit dem AQP1-Fragment.

Die Gewinnung des pGEM[®]-T Easy als Zwischenvektor erleichtert die Generierung eines endgültigen Expressionsvektors. Folglich wurde mit der Erarbeitung dieses Klonierungskonstrukts (**Abb. 35**) die Basis für eine anschließende, erfolgreiche Überexpression des AQP1-Fragments in humanen Chondrozyten geschaffen.

5 Diskussion

5.1 Basisuntersuchungen – Histologie und Immunhistochemie

Zielsetzung dieser Arbeit war es, mittels zellbiologischer und molekularbiologischer Analysemethoden, die Präsenz und Funktion von AQP1 in der Pathogenese der Osteoarthritis zu untersuchen. Zunächst erfolgte zur Veranschaulichung der experimentellen Ausgangssituation die Anfertigung histologischer Gewebepreparate. Die Preparate wurden zum Teil der HE-Färbung zugeführt, dienten aber auch dem immunhistochemischen Nachweis von AQP1. Die HE-Preparate zeigten arthrotypische Veränderungen des Knorpelgewebes (4.1.1, **Abb. 11**). AQP1 konnte verstärkt in den stärker geschädigten Knorpelarealen nachgewiesen werden, mit Lokalisation in der Tangentialzone (**Abb. 12**). Gleichlautende Befunde wurden bereits zuvor sowie parallel zur Erstellung dieser Arbeit erhoben und publiziert (Geyer et al., 2009; Hagiwara et al., 2013). Im gesunden hyalinen Knorpelgewebe des Menschen hingegen wurde eine vorrangige Expression von AQP1 in der tiefer gelegenen Radialzone beschrieben (Mobasher & Marples, 2004).

5.1.1 Aquaporin 1 und Zellmigration

Typischerweise ist die Zelldichte in den oberen Zonen arthrotisch veränderten Knorpelgewebes erhöht. Dies ist auch in den für diese Arbeit angefertigten histologischen Preparaten sichtbar (**Abb. 11b**). Die erhöhte Zelldensität wird mit Proliferation oder mit Zelldislokation in Folge des zunehmenden Matrixverlustes begründet. Chondrozyten im adulten Knorpelgewebe gelten als unbeweglich, da sie durch die von ihnen selbst synthetisierte, rigide Matrix als lokal fixiert angesehen werden (Söder & Aigner, 2011). Chondrozytäre Migration ist in der Embryonalentwicklung essentiell. Sie bewirkt im Rahmen der enchondralen Ossifikation die säulenartige Anordnung der Chondrozyten in der Wachstumsplatte (Dodds, 1930; Aszodi et al., 2003; Morales, 2007).

An explantierten Knochen-Knorpelstücken des Hüft-und Kniegelenkes, präpariert mit einem tiefen zentralen Einschnitt, konnte elektronenmikroskopisch beobachtet werden, wie die Zellintensität im „Verletzungsbereich“ im zeitlichen Verlauf zunahm. Diese Ausrichtung der Chondrozyten entlang der Ränder der künstlich herbeigeführten Wunde war mit Änderungen der Zellmorphologie verbunden. Die Zellen flachten ab, es kam zur Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts und zur Ausbildung von Membranausstülpungen, welche mit den Kollagenfibrillen interagierten, die parallel zur Schnittkante verliefen. Die Chondrozyten scheinen die Kollagenfasern als eine Art Leitschiene zu benutzen, um zum Defekt zu gelangen (Lyman J.R. et al., 2012). Weitere Studien berichten von einer auswärts gerichteten Bewegung von Chondrozyten humaner Knorpelimplantate in Kultur (Qiu et al., 2000; Lu et al., 2006). Voraussetzung für die Zellbewegung in allen zuvor angeführten Studien waren Beeinträchtigungen bzw. Störungen des Kollagennetzwerkes. Überträgt man die aus den Studien gewonnenen Erkenntnisse auf die Erkrankung Osteoarthritis, ist es vorstellbar, dass die Veränderung und Verletzung der Knorpelmatrix, zu der es im Verlaufe der Erkrankung kommt, die chondrozytäre Migration *in vivo* bewirken könnte (Morales, 2007).

Die chondrozytäre Migration könnte auch die histologisch sichtbar erhöhte Zellintensität in den geschädigten Knorpelarealen erklären. Dass AQP1 zusammen mit verschiedenen Membrantransportern an der Regulation des Zellvolumens beteiligt ist, wurde vielfach beschrieben (Schwab et al., 2012). Außerdem beeinflussen AQP1 und weitere Aquaporine das Migrationsverhalten verschiedener Zelltypen, auch das von isolierten Chondrozyten (Liang et al., 2008; Schwab et al., 2012). Die Bewegung von Zellen ist an die transiente Ausbildung von Membranausstülpungen (Lamellipodien) in deren Leitsaum gebunden. Es konnte beobachtet werden, dass AQP1 verstärkt im Leitsaum migrierender Zellen exprimiert wird (Saadoun et al., 2005). Dies gilt auch für einige weitere in die Zellmigration involvierte Transporter, wie dem Na^+/H^+ - oder dem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter. (Schwab et al., 2012). Ein Modell zur volumenabhängigen Zellmigration stellt die **Abb. 36** vor.

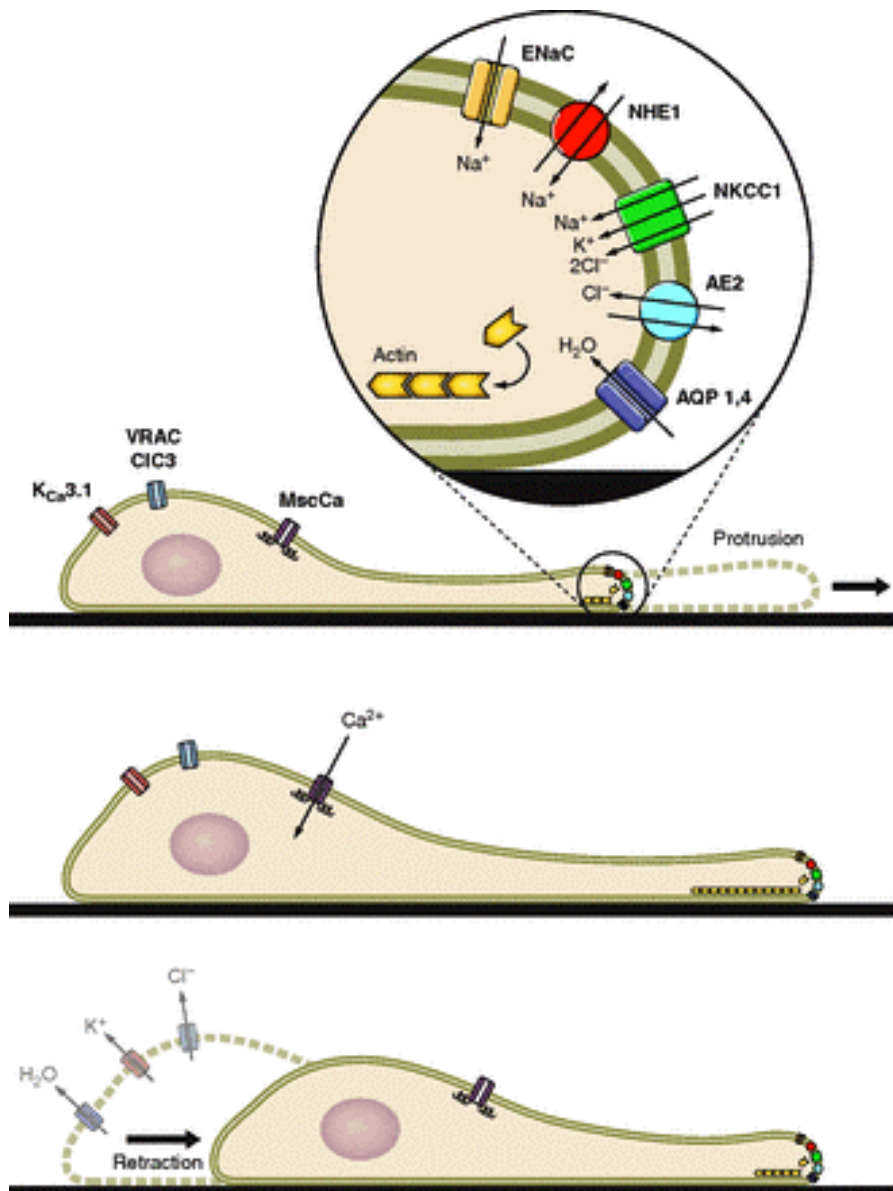


Abb. 36: Volumenänderungen während der Zellbewegung. Zellmigration ist ein kontinuierlicher Zyklus von Membranausstülpung (Protrusion) im Leitsaum und Retraktion am gegenüberliegenden Zellpol. Diesem kann eine isoosmotische Volumenzunahme im Leitsaum (Zitationen s. Quellenangabe) und eine isoosmotisch Volumenabnahme am anderen Ende zu Grunde liegen. Das Modell basiert auf gemessenen Volumenänderungen migrierender Zellen und dem subzellulären Vorkommen relevanter Ionenkanäle und Aquaporine. Die molekulare Natur des hier dargestellten mechanosensitiven Ca²⁺-Kanals ist noch unklar. Das Schema illustriert, wie die verschiedenen Transportsysteme während der Zellmigration kooperieren (Schwab et al., 2012).

Die Ausbildung von Membranausstülpungen geht immer mit Veränderungen der Zytoskelettorganisation einher (Alberts et al., 2005). Für AQP1 ist die Beeinflussung des Migrationsverhaltens von humanen Melanom- und Endothelzellen via Interaktion mit Lin-7, als Bestandteil eines heterotrimeren Proteinkomplexes des Zytoskeletts, beschrieben worden. Für eine Beeinflussung der chondrozytären Migration im Zusammenhang mit Osteoarthritis, würde die ausgeprägte Signalintensität von AQP1 in der oberflächlichen Tangentialzone der stärker lädierten Knorpelareale sprechen. Neben Lin-7 enthält der erwähnte Proteinkomplex noch die Interaktionsdomänen Lin-2 und Lin-10. Ob es ebenfalls zu einer Beeinflussung von Lin-2 durch AQP1 kommt, sollte im Zuge dieser Arbeit untersucht werden.

Die mittels Immunhistochemie visualisierte verstärkte Expression von AQP1 in den gelenkflächennahen Knorpelzonen sowie die durch Genchip-Analyse nachgewiesene Hochregulation des AQP1-Gens in Gewebespenden von Patienten mit Osteoarthritis sind Indikatoren für dessen Bedeutung in der Pathogenese dieser Erkrankung (Geyer et al., 2009; Karlsson et al., 2010; Hagiwara et al., 2013). Welche Rolle AQP1 hierbei z. B. in Bezug auf die Zellmigration zukommt, sollten die anschließenden Untersuchungen zum Knockdown und zur Überexpression von AQP1 auf zellulärer Ebene verdeutlichen.

5.2 Periostin

Parallel zu den AQP1 bezogenen Arbeiten wurde mit der Durchführung von experimentellen Untersuchungen begonnen, die die Funktion von Periostin (1.2.5) im Krankheitsverlauf der Osteoarthritis charakterisieren sollten. Hierzu wurden von den Knorpelgewebepräparaten zunächst immunhistochemische Färbungen angefertigt (**Abb. 13**). Die Färbungen zeigten, eine nahezu gleichbleibende Signalintensität in den gering und in den stark geschädigten Bereichen eines Gewebepräparates, mit einer leichten Tendenz zur Abnahme der Expressionshäufigkeit in den mehr geschädigten Arealen. Die Signale konnten, wie bei AQP1, in der oberflächlichen Tangentialzone nachgewiesen werden.

Eine Microarray-Analyse, die die humane Genexpression von Patienten mit Osteoarthritis des Kniegelenkes mit dem Expressionsprofil von gesunden

Gewebespendern verglichen, konnte eine 130-fache Hochregulation von Periostin für das pathologisch veränderte Gewebe feststellen. Die Patienten mit Osteoarthritis mussten sich, ebenso wie die Gewebespenden zur Erstellung dieser Dissertationsarbeit, einer Operation zum künstlichen Ersatz des Kniegelenkes unterziehen (Karlsson et al., 2010). Die eher stabile Signalfrequenz von Periostin in den eigenen immunhistochemischen Präparaten könnte somit bedeuten, dass Periostin im Laufe der Erkrankung ein gewisses Expressionsmaximum erreicht, welches mit zunehmendem Krankheitsprogress nicht mehr gesteigert werden kann. Interessant ist, dass trotz einer mehr als dreifach erhöhten Expressionssteigerung von Periostin (130,1) im Vergleich zu AQP1 (39,8) in der zuvor erwähnten Microarray-Analyse, AQP1 in den immunhistochemischen Präparaten der stärker geschädigten Knorpelareale insgesamt häufiger nachweisbar war (**Abb. 12** u. **13**). Dies kann durch individuelle Gewebeeigenschaften aber auch durch das methodische Vorgehen begründet sein. Die Expression von AQP1 scheint, zumindest im Vergleich zu Periostin, zum Ende der Erkrankung noch einmal deutlich hochreguliert zu werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten desweiteren die Auswirkungen des Knockdowns von AQP1 auf Periostin betrachtet werden (5.3.2). Um die Rolle von Periostin in der Pathogenese der Osteoarthritis zu klären, bedarf es weiterer Untersuchungen. Hierzu wurden im Rahmen des Forschungsprojektes weiterführende experimentelle Versuche von Frau Diplombiologin Lucija Berninger geplant und durchgeführt. Die Darstellung der generierten Ergebnisse wird im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit erfolgen, auf die hiermit verwiesen wird.

5.3 Ergebnisanalyse zum Knockdown von Aquaporin 1

Grundsätzlich gelten Chondrozyten und besonders humane Chondrozyten als schwer transfizierbar. Die Transfektionsrate von Chondrozyten, gewonnen aus arthrotisch verändertem Gewebe wie es auch im vorliegenden Fall verwendet wurde, fällt dabei noch einmal deutlich geringer aus (Madry & Trippel, 2000; Qureshi et al., 2008). Mit Hilfe des Amaxa Nukleofektionssystems und der entsprechenden siRNA konnten die isolierten Chondrozyten erfolgreich transfiziert und der signifikante Knockdown von AQP1 auf RNA-Ebene mit Hilfe der qRT-PCR (**Abb. 21**) und auf Proteinebene mittels Immunzytologie (**Abb. 14**) nachgewiesen werden.

5.3.1 AQP1 im Western Blot

Der Nachweis von AQP1 auf Proteinebene im Western Blot gelang jedoch weder für die unbehandelten, noch für die nukleofizierten Chondrozyten (**Abb. 17** u. **18**). Je Probe konnten hierbei max. 15 µg Gesamtproteinmenge eingesetzt werden. Als Positivkontrolle diente murines Nierengewebe mit einer Gesamtproteinmenge von 20 µg. Für das murine Gewebe konnte zunächst eine sehr starke Bande bei 55-70 kDa visualisiert werden (**Abb. 17**). Nach Verlängerung der Belichtungszeit wurde eine weitere schmalere Bande im Bereich des für AQP1 erwarteten Molekulargewichtes von ca. 32,2 kDa sichtbar (**Abb. 18**). Nach Rücksprache mit dem Hersteller des verwendeten AQP1-Antikörpers sind bisher keine Kreuzreaktivitäten mit anderen Aquaporinen aufgetreten. Daher ist anzunehmen, dass die deutlich stärker ausgeprägte Bande auf den Nachweis einer glykosylierten Form von AQP1 zurück zu führen ist. Bereits bei der Entdeckung und Erstbeschreibung von AQP1 wurde zwischen nicht-glykosyliertem und glykosyliertem AQP1 (35-60 kDa) unterschieden (Denker et al., 1988). AQP1 verfügt über verschiedene Glykosylierungsstellen. Die Annahme, dass es sich im vorliegenden Fall um eine glykosylierte Form von AQP1 handelt, wird durch weitere, zu späteren Zeitpunkten erstellte Publikationen gestützt (Devuyst et al., 1998; Pandey et al., 2010). Die Glykosylierung von Aquaporinen spielt unter anderem eine Rolle bei der Faltung des Proteins und ist wichtig für deren Expression an der Zelloberfläche (Hendriks et al., 2004; Buck & Skach, 2005). Zusammenfassend zeigen die **Abb. 17** u. **18**, dass die aus den Chondrozyten gewonnene Proteinmenge zu gering für den Nachweis von AQP1 war. Somit ist für einen erfolgreichen Nachweis von AQP1 im Western Blot zu überlegen, wie die Proteinmenge erhöht werden könnte. Möglich wäre die Steigerung der Proteinkonzentration durch eine verstärkte Selektion von geeigneten Chondrozytenpopulationen mittels Vitalitätsbestimmung (3.1.4) sowie durch Proteinfällung. Voraussetzung hierfür ist die Generierung einer ausreichend großen Menge humanen arthrotisch veränderten Knorpelgewebes. Denkbar wäre auch die Testung weiterer AQP1-Antikörper verschiedener Hersteller. Alle erwähnten Maßnahmen setzen eine entsprechend größere Materialmenge voraus.

5.3.2 Parameteranalyse

Um die Auswirkungen des AQP1-Knockdowns auf den Zellstoffwechsel zu untersuchen, wurden in ihrer Funktion für das Knorpelgewebe bereits bekannte Stoffwechselfparameter ausgewählt (1.2.2-1.2.4). Für diese Stoffwechselfparameter ergab sich zwar im einzelnen, nicht aber für die Gesamtheit der Proben, eine signifikante Änderung gegenüber den Kontrollen nach Auswertung mittels qRT-PCR. Eine Tendenz zur Hochregulation ist für MMP-13, als bekanntermaßen aktivstes Enzym im Rahmen des erkrankungsbedingten Kollagenabbaus, erkennbar (**Abb. 22** u. 1.2.4).

Es ist nicht auszuschließen, dass sich der Knockdown von AQP1 auf andere, an dieser Stelle nicht einbezogene bzw. erfasste Stoffwechselfparameter, auswirkt. Diesbezüglich könnte eine Vielzahl von weiteren Faktoren untersucht werden, wie z. B. verschiedene Kollagene und MMP's, TIMP's, COMP etc. (1.2.2-1.2.4). Um mehrere Parameter gleichzeitig erfassen zu können, wäre zwar die Durchführung einer Microarray-Analyse geeignet. Hierfür wären aber auch deutlich mehr Ressourcen notwendig.

Für den Transkriptionsfaktor SOX9 und die Proteininteraktionsdomäne Lin-2 konnten ebenfalls keine signifikanten Expressionsmuster im Zuge des Knockdowns von AQP1 ermittelt werden.

Die Hochregulation von Periostin bei n=1, vor allem in Zusammenschau mit den für die anderen untersuchten Parameter erhobenen Messdaten, bietet ebenfalls keine Grundlage für eine veritable Hypothesenbildung.

5.3.3 Kompensation des Knockdowns

Die Kompensation des Knockdowns von AQP1 durch andere am Wassertransport beteiligte Kanäle wäre ebenfalls eine Erklärung für die erhaltenen Messergebnisse. So wird neben AQP1 auch AQP3 als Aquaglyceroprotein im gesunden hyalinen Gelenkknorpel exprimiert. AQP1 und AQP3 zeigen diesbezüglich nicht nur die gleiche Lokalisation im Gewebe (vorwiegend Radialzone; orientierend siehe **Abb. 4**) sondern auch eine sehr ähnliche Expressionshäufigkeit (Mobasheri & Marples, 2004; Mobasheri et al., 2005). Im krankheitsbedingt verändertem Gewebe wurde AQP3 in der tiefen

Radialzone, der Übergangszone, sowie der oberflächlichen Tangentialzone immunhistochemisch nachgewiesen, während AQP1 überwiegend in der Tangentialzone exprimiert wurde (Geyer et al., 2009; Hagiwara et al., 2013). Es wäre vorstellbar, dass infolge des Knockdowns von AQP1, AQP3 und verschiedene Ionenkanäle zusammen agieren, um das für die Zellen essentielle Membranpotential aufrecht zu erhalten. Denn wie bei anderen Zellen auch, wird bei Chondrozyten das Membranpotential ebenfalls durch ein Gleichgewicht von positivem und negativem Ionenfluss durch die Zellmembran bestimmt. Der Ionenfluss wiederum wird durch Ionenkanäle kontrolliert (Hodgkin & Huxley, 1952). Diese Kanäle sind eingebettet in die Zellmembran und verfügen über zentrale Wasserporen, die sich auf unterschiedliche Reize (mechanisch, chemisch, spannungsabhängig) hin öffnen (Löffler et al., 2003). Chondrozyten verfügen über eine Vielzahl von Kanälen (**Abb. 37**), die an ihrer Volumenregulation beteiligt sind und die Auswirkungen des AQP1-Knockdowns möglicherweise kompensieren (Barrett-Jolley et al., 2010; Lewis et al., 2011).

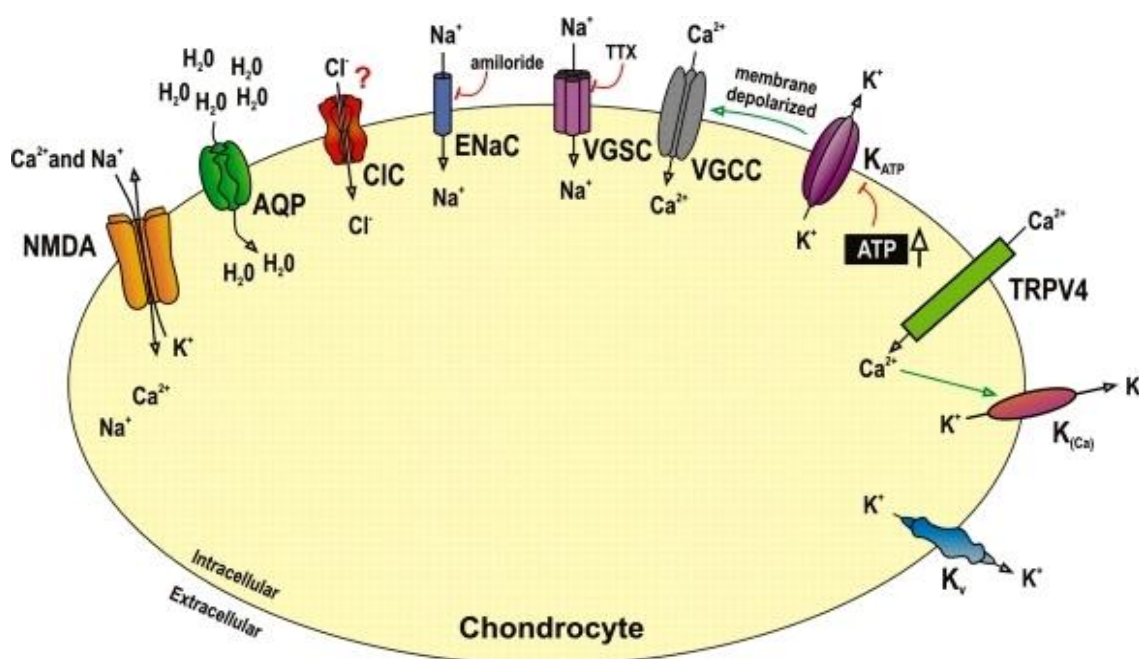


Abb. 37: Übersicht zu chondrozytären Kanälen. K(Ca), Kalziumaktivierte Kaliumkanäle mit hoher Leitfähigkeit (BK) und niedriger Leitfähigkeit (SK); AQP, Aquaporinkanal; CIC, Chloridkanal; ENaC, epithelialer Natriumkanal; KATP, ATP abhängiger Kaliumkanal; K_v, spannungsabhängiger Kaliumkanal; NMDA-Rezeptor, N-methyl D-aspartate; TRP, transient receptor potential channel; VGCC, spannungsabhängiger Kalziumkanal; VGSC, spannungsabhängiger Natriumkanal (Barrett-Jolley et al., 2010).

5.3.4 Zellstress durch Nukleofektion

Der Knockdown von AQP1 konnte mit Hilfe des Amaxa Nukleofektions-Systems erfolgreich durchgeführt und anschließend mittels qRT-PCR sowie immunzytochemisch verifiziert werden. In wieweit die Nukleofektionsprozedur selbst die Zellviabilität und somit den Stoffwechsel der Chondrozyten beeinflusst hat, ist unklar. Diesbezügliche Publikationen sind kaum vorhanden. Verschiedene Untersuchungen an Chondrozyten beschreiben die Effizienz des Verfahrens bzgl. des schnellen zeitlichen Eintritts der gewünschten Genexpression (innerhalb von 24 h) und der Anzahl der nukleofizierten Zellen (> 70 %) (Hamm et al., 2002; Gresch et al., 2004; Welter et al., 2004; Haag et al., 2009). Für die Transfektion mittels Lipofektion werden beispielsweise nur Transfektionsraten bis 27 % beschrieben (Madry and Trippel, 2000; Gresch et al., 2004). Virale Transfektionsmethoden erreichen die höchsten Transfektionsraten (bis zu 100 %), sind jedoch an einen ungleich höheren Labor- und Kostenaufwand sowie an starke Sicherheitsauflagen gebunden (Doherty et al., 1998; Ueblacker et al., 2007; Haag et al., 2009). Eine vergleichende Studie bzgl. Lipofektion und Nukleofektion an humanen Keratinozyten und Fibroblasten beschreibt die schneller eintretende und höhere transgene Expressionsrate nach Nukleofektion. Die Zytotoxizität der Methode ist allerdings ebenfalls stärker ausgeprägt. Zudem stellte die Studie eine höhere Proliferationsrate und eine geringere Beeinflussung der Zellmorphologie auf Seiten der Lipofektion fest (Jacobsen et al., 2006). Die Nukleofektion mittels des Amaxa-Systems inkludiert die Verwendung eines Elektroporationsgerätes (3.1.6). Es ist anzunehmen, dass die Abgabe von elektrischen Impulsen zur Einschleusung der Fremd-DNA eine gewisse „Belastung“ für die behandelten Zellen darstellt. Anhand der immunzytologischen Verlaufsbeobachtung (4.2.1) konnte für die mit AllStars Negative Control siRNA nukleofizierten Zellen eine stetige Abnahme der Signalintensität von AQP1 festgestellt werden (Tag 1-7). Dies deutet auf eine abnehmende Zellvitalität hin, eventuell beeinflusst durch die Nukleofektion. Letztlich ist die Nukleofektion aber die deutlich effizientere Methode.

Alternativ wurden auch andere, z. B. chemische Blockademöglichkeiten des AQP1-Kanals in Erwägung gezogen. Da AQP1 im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen steht (1.3.3) und somit eine interessante pharmakologische Interventionsmöglichkeit darstellt, sind hierzu einige Forschungsansätze bekannt. Bis dato fehlt es jedoch an (eindeutig) spezifischen AQP1-Antagonisten, die für den experimentellen und praktischen erkrankungsbezogenen Einsatz geeignet sind (Xiang

et al., 2004; Yang et al., 2006; Gao et al., 2006; Sogaard & Zeuthen, 2008; Seeliger et al., 2013).

5.3.5 Analyse der Populationsvarianzen - Limitationen

Das Verständnis physiologischer sowie pathophysiologischer Abläufe und Wechselbeziehungen im Gelenkknorpel beruht hauptsächlich auf tierexperimentellen Untersuchungen. Forschungsmodelle humanen Ursprungs sind selten (Goldring & Goldring, 2007). In dieser Arbeit wird humanes Knorpelgewebe verwendet. Dies begründet zugleich eine wichtige Limitation: die Generierung einer ausreichenden Materialmenge eines bereits pathologisch veränderten Gewebes. Für den Knockdown von AQP1 konnten 8 Spenderproben von Patienten mit diagnostizierter und chirurgischerseits interventionsbedürftiger Osteoarthritis untersucht werden. Die Spender waren zwischen 59 und 75 Jahren alt, vier männlichen Geschlechts, mit unterschiedlichen Begleiterkrankungen und daraus resultierender Medikation. Mögliche Einflussfaktoren, die zur vorliegenden Ergebniskonstellation geführt haben könnten, sollen im Folgenden diskutiert werden.

Grunderkrankung (primäre Gonarthrose) sowie Entnahmezeitpunkt (intraoperativ, zum Zwecke einer endoprothetischen Versorgung) der Gewebeproben stimmten überein. Die Inspektion der explantierten und für diese Studie verwendeten Knochen-Knorpelplatten zeigten jedoch nicht nur unterschiedlich stark geschädigte Areale an einem Explantat selbst, sondern auch einen unterschiedlich stark ausgeprägten Knorpelverlust zwischen den verschiedenen Explantaten bis hin zur Knochenglatze. Die Diagnose „primäre Gonarthrose“ war bei allen Gewebespendern medizinisch gesichert und die Indikation zum künstlichen Gelenkersatz ärztlicherseits gestellt worden. Die Diagnose- und Indikationsstellung zur operativen Versorgung stützt sich unter anderem auf die Erhebung einer krankheitsspezifischen Schmerzsymptomatik, von charakteristischen Funktionseinschränkungen und typischen radiologischen Veränderungen, wobei Schmerzwahrnehmung und der radiologische Befund nicht unbedingt miteinander korrelieren (Peat et al., 2006). Einer Studie zu Folge hatte nur ca. die Hälfte der untersuchten Probanden mit radiologisch manifester Osteoarthritis auch Schmerzen im Kniegelenk und nur etwa zwei Drittel der Probanden mit anhaltenden Knieschmerzen auch radiologisch nachweisbare Gelenkveränderungen (Hannan et al., 2000). Die Schmerzwahrnehmung ist grundsätzlich individuell und wird

auch im Falle der Osteoarthrose von verschiedenen, z. B. psychosozialen, Faktoren beeinflusst (Dieppe & Lohmander, 2005). Die Indikationsstellung zur endoprothetischen Versorgung ist somit maßgeblich von subjektiven, individuellen Faktoren beeinflusst. Dies würde auch den beobachteten unterschiedlich stark ausgeprägten Knorpelabrieb an den für diese Arbeit verwendeten OP-Präparaten erklären. Aufgrund des ungleichen Knorpelabriebs wurden divergierende Ausgangsmengen an Knorpelgewebe (2,3 g–4,5 g) je Explantat gewonnen, mit Schwankungen bezüglich der Zellanzahl (pro g Knorpel: 764.000-5.061.000; insgesamt: 2.675.000-20.750.000) und der Zellvitalität (92,3-98,6 %) der isolierbaren und für den Knockdown eingesetzten Chondrozyten.

Einfluss auf Anzahl und Vitalität der Chondrozyten hat auch das Alter der Spender. So wurde bei den untersuchten Gewebeproben die Tendenz sichtbar, dass mit zunehmendem Alter die Anzahl der isolierbaren Chondrozyten sowie deren Vitalität sank (z. B.: Patient 60 Jahre: 4,3 g Knorpel, 4.227.000 Mio. Zellen pro g Knorpel, 18.175.000 Zellen insgesamt, Vitalität 98 % vs. Patient 75 Jahre: 2,3 g Knorpel, 1.174.000 Zellen pro g Knorpel, 2.700.000 Zellen insgesamt, Vitalität 92,3 %). Die Osteoarthrose ist eine altersassoziierte Erkrankung (WHO, 2003). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch unzureichend geklärt. Vermutet werden kumulative Einflüsse durch andauernde mechanische Knorpelbelastung, altersbedingte Matrixveränderungen, eine zunehmende Apoptoserate aller Gelenkzellen, mitochondriale Degeneration sowie die Einflussnahme durch Alterungsprozesse der Chondrozyten (Aigner & Richter, 2012). Bekannt ist, dass die synthetische Aktivität der Chondrozyten mit zunehmendem Alter nachlässt. Dies kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass die alternden/gealterten Chondrozyten weniger Rezeptoren für die Bindung von Wachstumsfaktoren exprimieren (Martin et al., 1997). Microarray-Analysen konnten Unterschiede in der Genexpression von Mäusen verschiedenen Alters mit experimentell induzierter Osteoarthrose aufzeigen. Diese Genanalyse hat auch eine unterschiedlich starke, altersabhängige Expression von Genen (z. B. ADAMTS-5, MMP-13, Kollagen Typ IX und Periostin) herausgearbeitet, deren Genprodukte im Zuge des AQP1-Knockdowns für die Erstellung dieser Dissertationsarbeit untersucht wurden (Loeser et al., 2012b).

Letztlich verdeutlichen diese Forschungsergebnisse, dass Chondrozyten altersabhängig reagieren und mit zunehmenden Alter Fähigkeiten zur Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase verlieren (Loeser, 2009; Aigner & Richter, 2012). Grundlage für diese Dissertation war die Arbeit mit alternden/gealterten Zellen, die aus pathologisch verändertem Gewebe stammen, welches von Patienten

entnommen wurde, deren Erkrankung sich nach medizinischen Gesichtspunkten im Endstadium befand. Diese Zellen sind in ihren metabolischen Fähigkeiten zusätzlich eingeschränkt, was die ermittelten Werte in Folge des AQP1-Knockdowns beeinflusst haben könnte.

Die bisher erörterten sowie weitere Einflussfaktoren, wie das Geschlecht und die damit verbundenen hormonellen Einflüsse oder Fettstoffwechsel und Gewicht, die zur Entwicklung einer Osteoarthritis beitragen, können in ihrer Bedeutung für die Gewebe- und Zellvitalität an dieser Stelle nicht abschließend bewertet werden. Ihre Vielzahl, Vielfältigkeit sowie ihre möglichen Wechselspiele verdeutlichen die Komplexität dieser multifaktoriellen Erkrankung und die damit verbundenen Erschwernisse bzgl. der notwendigen Forschungsarbeiten mit daraus resultierenden Behandlungsoptionen. Im vorliegenden Fall könnte die Erhöhung der Probenanzahl und die daraufhin mögliche Aufnahme von weiteren Auswahlkriterien zum Ausschluß oder zur Gruppenbildung (z. B. mit Unterteilung nach Alter und Geschlecht) zur Schaffung eines ausreichend großen, homogenen Genpools beitragen, um valide Messergebnisse zu erzielen. Auch eine differenziertere histologische Betrachtung und Einstufung der Gewebepreparate beispielsweise mit Hilfe des Mankin-Scores, würde voraussichtlich Einfluss auf die Ergebniskonstellation nehmen (Aigner & Söder, 2008). Darüberhinaus wäre es wichtig, nicht nur die unterschiedlich geschädigten Knorpelareale in einem Gelenk zu betrachten, sondern eine altersentsprechende Kontrollgruppe von Menschen ohne Osteoarthritiszeichen (klinisch, makroskopisch sowie mikroskopisch) gegenüber zu stellen (Aigner et al., 2006; Karlsson et al., 2010). Diese Maßnahmen erfordern die Generierung einer ausreichend großen Materialmenge humanen Ursprungs sowie einen entsprechenden materiellen, wie personellen Aufwand.

5.4 Überexpression

Die Überexpression von Membranproteinen stellt eine große Herausforderung für die Forschung dar. 20-30 % aller Gene in Pro- und Eukaryonten codieren für Membranproteine, die wiederum eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Ihre Bedeutung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass ca. 50 % aller Medikamente auf die Beeinflussung ihrer Funktionen ausgerichtet sind. Die Überexpression von Membranproteinen zur Durchführung funktioneller und struktureller Studien gestaltet

sich allerdings oftmals schwierig. Die Gründe hierfür sind nicht immer eindeutig zu eruieren, aber sicherlich auch auf die Komplexität der Proteinbiosynthese zurückzuführen. Zu Problemen kann es beispielsweise bei der Verteilung des synthetisierten Proteins auf das Zielkompartiment (Proteinadressierung), bei dessen Einbau in die Plasmamembran oder dessen korrekter Faltung kommen (Drew et al., 2003; Wagner et al., 2006; Nyblom et al., 2007).

5.4.1 Amplifizierung und Ligation

Vorraussetzung für eine gelungene Überexpression ist zunächst die Generierung des zu klonierenden DNA-Fragmentes. Hierzu erfolgte die Isolierung von RNA aus den kultivierten Chondrozyten und deren Umschreiben in cDNA mittels reverser Transkription. Die gewonnene cDNA diente als Template für die Amplifizierung des AQP1-Fragmentes in der PCR. Bevor mit der Amplifizierung begonnen werden konnte wurden Primer designt, die das AQP1-Fragment mit den entsprechenden Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende für die Ligation mit dem gewünschten Vektor (pQE-Trisystem) versehen sollten. Angestrebt wurde die Ligation mit kohäsiven Enden (sticky ends, 3.4.6 u. 3.4.7), als sehr effektives Verfahren (Hirsch-Kauffmann, 1987). Das AQP1-Fragment konnte in der PCR amplifiziert werden. Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt gelang die Ligation mit dem Vektor, der nachweislich über die passenden Schnittstellen verfügte und dessen Autoligation durch die Zugabe von alkaliner Phosphatase vorgebeugt wurde, nicht. Nach erneutem Primerdesign zur Überprüfung der Fragmentschnittstellen, war im Sequenzierungsergebnis ersichtlich, dass das amplifizierte AQP1-Fragment nicht über die erwarteten Schnittstellen verfügte. Warum in der PCR die gewünschten Überhänge nicht erzeugt werden konnten ist unklar. Für das Primer-Design wurden alle grundlegenden Überlegungen, wie beispielsweise eine angemessene Schmelztemperatur und Anpassung der Annealing-Temperatur in der PCR oder aber auch zur Vermeidung einer möglichen Primer-Dimerisierung oder Sekundärstrukturbildung (Hairpins), einbezogen und mittels entsprechender Software erstellt und überprüft (2.11). Beeinträchtigungen des Amplifizierungsvorganges durch die verwendeten Materialien und Geräte konnten ebenfalls nicht determiniert werden.

Nachdem die Ligation durch die fehlenden Überhänge am AQP1-Fragment (kohäsive Enden) nicht möglich war, wurde die im Vergleich etwas weniger effektive Ligationsvariante mit glatten Enden (blunt ends) versucht (Hirsch-Kauffmann, 1987).

Die Ligation des Fragmentes mit glatten Enden war weder mit dem bis dato verwendeten Vektor (pQE-Trisystem), noch mit einem Klonierungsprozesse vereinfachenden Zwischenvektor (pBlueScript KS II (+)) erfolgreich. Erst mit Hilfe eines weiteren Verfahrens (TA-Klonierung, 3.4.7) und eines weiteren hierzu geeigneten Vektors (pGEM[®]-T Easy) gelang die Ligation. Zuvor waren mögliche negative Einflussnahmen auf die Ligation durch verwendete Materialien (Ligase, Puffer etc.), Konzentrationen und angewendete Verfahren immer wieder ausgeschlossen worden. Störungen durch die einzufügende DNA sind ebenfalls möglich. Beispielsweise lassen sich große DNA-Fragmente (> 3000-5000 bp) schlechter in Vektoren ligieren als kleinere Fragmente (Mülhardt, 2009). Aber auch diese Möglichkeit ist in Bezug auf das AQP1-Fragment mit einer ursprünglichen Größe von 810 bp und einer geringen Größenzunahme durch das Anfügen von Basenüberhängen für die Durchführung der jeweiligen Ligationsvariante als eher unwahrscheinlich anzusehen.

5.4.2 Transformation

Das erhaltene Ligationsprodukt (Plasmid) sollte zur Vervielfältigung in chemisch-kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien transformiert werden. Diese *E. coli*-Bakterien werden zur Klonierung wegen ihrer hohen biologischen Aktivität und anspruchslosen Haltung eingesetzt. Darüberhinaus ermöglichte der hier verwendete Bakterienstamm die Durchführung des Blau-Weiss-Screenings (3.3.3). Die chemische Kompetenz der Bakterien als Voraussetzung für die Transformation war bei den käuflich erworbenen Bakterien bereits durch den Hersteller induziert worden. Bei den aus einer Schenkung erhaltenen *E. coli* DH5 α -Bakterien wurde die chemische Kompetenz (basierend auf der Verwendung von Calciumchlorid) im eigenen Labor erzeugt (3.3.2). Zur Anwendung gebracht, unterschieden sich die Bakterien verschiedenen Ursprungs bezüglich ihrer Kompetenz, Aktivität und Vitalität nicht. Die Transformation erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Dieses schließt auch den Hitzeschock der Bakterien ein, der die Aufnahme des Ligationsproduktes erleichtern soll (Froger & Hall, 2007). Wie im Ergebnisteil dargestellt, enthielt nach der Transformation nur einer von 30 abgetragenen und bereits mittels Blau-Weiss-Screening selektierten Klone die gewünschte Plasmid-DNA. Diese Plasmid-DNA wurde zur Vervielfältigung erneut in *E. coli*-Bakterien vom Stamm DH5 α transformiert. Im Folgenden konnten nur zwei entsprechende Klone gewonnen werden, von denen anschließend Dauerkulturen angelegt wurden. Die Transformationseffizienz war unter Verwendung einer

herkömmlichen, bekannten Methode und eines zuvor vielfach eingesetzten und standardisierten Protokolls sehr gering. Es ist trotzdem nicht auszuschließen, dass die Transformationsmethode im vorliegenden Fall besonders wachstumseinschränkend für die verwendeten *E. coli*-Bakterien war. Eventuell übt aber auch die Kombination aus eingesetzter Transformationsmethode und der einzuschleusenden Plasmid-DNA einen entsprechend negativen Einfluss auf die Vitalität der Bakterien aus. Möglicherweise wird die eingebrachte DNA als fremd erkannt und verstärkt den Stress für die Bakterien. Die Aktivierung von proteolytischen Systemen könnte die Folge sein, wie sie bei *E. coli*-Bakterien beobachtet werden konnte, in deren Zellmembran selbst die Überexpression von Membranproteinen induziert werden sollte.

Ursächlich für den erschwerten Klonierungsverlauf könnte auch ein unzureichender Verschluss des eingeschleusten Vektors sein. *E. coli*-Bakterien regulieren ihren Wasserhaushalt ebenfalls mit Hilfe von Aquaporinen. Das bakterielle AQPZ wird hierbei als Gegenstück des humanen AQP1 angesehen und beschrieben. Die beiden Wasserkanäle weisen eine weitreichende strukturelle und auch gewisse funktionelle Ähnlichkeit auf (Borgnia et al., 1999; Calamita, 2000). Es wäre also vorstellbar, dass es aufgrund einer „Vektorlücke“ zu einer, die Zellvitalität störenden, Expression von AQP1 in den hier verwendeten *E. coli*-Bakterien gekommen ist.

Insgesamt konnte aber ein Klonierungsmodell für AQP1 als Basis für dessen spätere Überexpression in humanen Chondrozyten generiert werden. Aufbauend auf diesem Resultat wurden die weiteren Arbeiten zur Realisierung der Überexpression von Frau Diplombiologin Lucija Berninger übernommen. Die Ergebnisdarstellung wird im Rahmen ihrer Dissertationsarbeit erfolgen.

5.5 Schlussfolgerungen

Die experimentelle Arbeit mit humanen Chondrozyten und besonders mit Chondrozyten aus arthrotisch verändertem Gewebe ist schwierig und unterliegt, wie auch im vorliegenden Fall, verschiedenen Limitationen (Aigner & Richter, 2012). Weitergehende Untersuchungen sind jedoch für die Erkrankten selbst und aufgrund der gesamtgesellschaftlichen, krankheitsbedingten Auswirkungen notwendig. Diese Arbeit leistet somit einen Beitrag zur Vereinfachung und Verbesserung der

experimentellen Methodik und lässt in Bezug auf die zu erwartenden Ergebnisse der Überexpression noch Spielraum für die tatsächliche Rolle von AQP1 in der Pathogenese der Osteoarthritis. Die Osteoarthritis ist, allein aufgrund ihrer multifaktoriellen Genese, eine sehr komplexe Erkrankung. Die kausale Behandlung ist entscheidend. Dies setzt Forschungen zum verbesserten Verständnis der Pathogenese voraus. Da es keine einfachen Lösungs- bzw. Behandlungsansätze gibt, kommt der Prävention und auch der Einbeziehung konservativer Maßnahmen (Bewegungsschulung, Physiotherapie, Gewichtsreduktion, etc.) besondere Bedeutung zu. Dies vor allem, da diese Maßnahmen in ihrem Potential bis dato nur unzureichend genutzt werden (Hunter & Felson, 2006; Hunter, 2011).

6 Zusammenfassung

Die Osteoarthritis ist die Gelenkerkrankung mit der weltweit höchsten Prävalenz. Das Krankheitsbild weist eine multifaktorielle Genese auf und tritt in verstärktem Maße mit zunehmendem Lebensalter auf. Die therapeutischen Maßnahmen beschränken sich überwiegend auf den Einsatz antiphlogistisch und analgetisch wirksamer Medikamente sowie chirurgischer Interventionsmöglichkeiten bis hin zum endoprothetischen Gelenkersatz. Aufgrund der demographischen Entwicklung bedarf es weiterer, den Erkrankungsverlauf positiv modulierender Therapieansätze, um die zunehmenden sozioökonomischen Herausforderungen zu bewältigen. Dies setzt ein verbessertes Verständnis der Pathogenese der Erkrankung Osteoarthritis voraus.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Wasserkanals AQP1 im humanen arthrotisch veränderten Knorpelgewebe auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene zu untersuchen. Zur Durchführung der Untersuchungen wurden Chondrozyten aus Spenderpräparaten von Patienten mit Osteoarthritis des Kniegelenkes isoliert. Im Folgenden wurden die Chondrozyten mittels RNA-Interferenz-Technologie (RNAi) nukleofiziert, um das für AQP1 codierende Gen herunter zu regulieren (Knockdown). Der erfolgreiche Knockdown konnte auf RNA-Ebene durch den Einsatz der qRT-PCR und auf Proteinebene in der Immunzytologie verifiziert werden. Anschließend wurden die Auswirkungen des Knockdowns auf bekannte Indikatoren des anabolen (Kollagen Typ I, II und IX) sowie katabolen (MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, und ADAMTS-5) chondrozytären Stoffwechsels und auf weitere Parameter (Lin-2, Periostin, SOX9) mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Die Ergebnisse zeigten keine statistische Signifikanz. Unter anderem waren die Populationsvarianzen zu stark ausgeprägt. Die Untersuchung eines homogenen Genpools und von Vergleichspräparaten knorpelgesunder Gewebespender, unter Berücksichtigung weiterer zellspezifischer Parameter könnte eindeutige Ergebnisse ermöglichen. Die Realisierung unterliegt jedoch einigen Limitationen (Materialmenge, personeller sowie materieller Aufwand).

Parallel zu den Untersuchungen zum Knockdown von AQP1 wurde mit den Arbeiten zur Etablierung eines Überexpressionsmodells des Gens in den verwendeten humanen Chondrozyten begonnen. Nach der RNA-Isolierung aus den Chondrozyten und Gewinnung von cDNA mittels reverser Transkription, konnte das AQP1-Fragment in der PCR erfolgreich amplifiziert werden. Anschließend gelang es, nach Testung

verschiedener Ligationsvarianten und Vektoren, mit der TA-Klonierung das AQP1-Fragment in den Vektor pGEM®-T Easy einzufügen und in *E. coli*-Bakterien zu transformieren. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit der Grundstein für weiterführende Untersuchungen mit dem Ziel der Überexpression von AQP1 in humanen Chondrozyten und der Beobachtung seiner Auswirkungen gelegt.

Summary

Osteoarthritis (OA) is the most prevalent joint disease worldwide. The pathogenesis of OA is multifactorial and strongly associated with increasing age. The treatment options are still limited to the pharmacological management of pain and inflammation and to surgical interventions including joint replacement surgery, respectively. There is a need for disease-modifying drugs to manage the increasing societal impact of OA considering the demographic transition. The keypoint is a better understanding of OA pathogenesis.

The aim of this work was to evaluate the role of the water transporting channel Aquaporin 1 (AQP1) in the pathogenesis of human OA. Experimental studies were performed applying molecular biological methods. Chondrocytes isolated from cartilage tissues of patients suffering from OA of the knee were nucleofected for silencing the gene expression of AQP1 (knockdown) by means of RNA interference technology (RNAi). After verification of a successful knockdown by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) at the RNA-level and by immunocytochemistry at the protein-level the implications for anabolic (Collagen Type I, II and IX) and catabolic (MMP-9, MMP-13, ADAMTS-4, und ADAMTS-5) parameters of cellular metabolism as well as for related molecules (Lin-2, Periostin, SOX9) were analyzed by using qPCR. Unfortunately, statistical analysis detected no significant changes with respect to all expression levels. This result could be predominantly due to the marked variance of the study population. Creating a more homogeneous gene pool of patients with OA matched with tissues of healthy donors and observing a broader spectrum of biological parameters might be necessary to obtain a more specific OA pattern. The implementation, however, is limited by several factors e.g. the shortage of human cartilage tissue, manpower and material costs.

Simultaneously to the AQP1 knockdown analysis and to pursue an alternative strategy, experiments have been conducted to establish an AQP1 overexpression model in human chondrocytes. After isolating RNA of the chondrocytes and assembling cDNA by reverse transcription, it was possible to amplify the AQP1 DNA-fragment using polymerase chain reaction (PCR). In a next step, different ligation methods and vectors have been tested. Applying TA-cloning and using the pGEM®-T Easy Vector the transformation of the AQP1 fragment into *E. coli* bacteria was successful. Thus, the basis for further investigations regarding AQP1 overexpression was created.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AMV	avian myeloblastosis virus
APS	Amoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
BMP	bone morphogenetic protein
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropan-sulfonsäure
CASK	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase
CFI	complement factor I
Coll	Kollagen Typ
COMP	cartilage oligomeric protein
COX	Cyclooxygenase
ct	cycle threshold
DAF	decay accelerating factor, CD55
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNER	delta/notch like EGF-related receptor
cDNA	complementary DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	epidermal groth factor
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
for	forward
g	1.: Zentrifugenbeschleunigung; 2.: Gewichtseinheit: Gramm

GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HS	Hyaluronsäure
Ig	Immunglobulin
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria broth
M	molar; Molekülgewicht
mA	Miliampere
mM	Milimolar
mm	Milimeter
min.	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteinase
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
n	Größe der Grundgesamtheit
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPA	asparagine-proline-alanine
n.s.	nicht signifikant
OA	Osteoarthritis
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline

PCR	Polymerasekettenreaktion
PDZ-Domäne	Proteininteraktionsdomäne
PGOA	primär generalisierte Osteoarthritis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
RA	rheumatoide Arthritis
rev	reward
RF	Regulationsfaktor
mRNA	messenger RNA
siRNA	small interfering RNA
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
ROS	reactive oxygen species
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SDS	SodiumDodecyl Sulfate/Natriumlaurylsulfat
SOX	sex determining region Y (SRY)- box
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris buffered saline with tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitors of metalloproteinase
TMA	tissue microarray analysis
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl-aminomethan)
U	Unit
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vergr.	Vergrößerung
WB	Western Blot
WISP	Wnt-induced signaling protein
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Abb. 1:	Das Organsystem Gelenk: Schema eines Kniegelenkes mit Darstellung der bei Osteoarthrose beeinträchtigten Gewebe.	2
Abb. 2:	Beispiel für einen Behandlungsalgorithmus im Management von Patienten mit Osteoarthrose.	3
Abb. 3:	Darstellung eines Gelenkknorpelfragmentes.	5
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Verlaufes der Kollagenfibrillen im Gelenkknorpel.	6
Abb. 5:	Die Abbildung zeigt Kollagen-Komponenten (Kollagen Typ II, IX und XI) einer Knorpelfibrille etc..	8
Abb. 6:	Chondrozytenaktivierung infolge einer traumatischen Knorpelverletzung.	13
Abb. 7:	Sanduhr-Modell von Aquaporin 1.	16
Abb. 8:	Struktur der Aquaporin-Monomere und tetramerische Anordnung in Zellmembranen.	17
Abb. 9:	Resezierte Kniegelenksanteile nach Ankunft im Labor und vor der Weiterverarbeitung.	38
Abb. 10:	Zur Durchführung der SDS-Page verwendete Apparaturen.	58
Abb. 11:	Orientierende Primärfärbung mit Hämatoxylin-Eosin zur Darstellung der unterschiedlich betroffenen Knorpelareale eines Operationspräparates (Vergr. 10x).	62
Abb. 12:	Immunhistochemische Färbung gegen AQP1 (rot) des in Abb. 11 dargestellten Operationsresektates (Vergr. 10x).	63
Abb. 13:	Immunhistologische Färbungen gegen Periostin.	64
Abb. 14:	Immunzytologische Färbung der Chondrozyten auf AQP1 einen Tag nach der Nukleofektion.	65
Abb. 15:	Immunzytologische Färbung der Chondrozyten auf AQP1 am dritten Tag nach der Nukleofektion.	66
Abb. 16:	Immunzytologische Färbung der Chondrozyten auf AQP1 am siebten Tag nach der Nukleofektion.	67
Abb. 17:	AQP1-Nachweis im Western Blot nach 1 min. Belichtungszeit.	69
Abb. 18:	AQP1-Nachweis im Western Blot nach 7 min. Belichtungszeit.	70

Abb. 19:	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des SDS-Polyacrylamidgels nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran.	71
Abb. 20:	Ladekontrolle mit Cyclophilin B im Western Blot.	71
Abb. 21:	AQP1-Knockdown nach relativer Quantifizierung in der RT-PCR.	72
Abb. 22:	Regulation verschiedener chondrozytärer Stoffwechselfparameter infolge des AQP1-Knockdowns.	73
Abb. 23:	Darstellung der Primer für die Amplifizierung von AQP1 in der PCR.	75
Abb. 24:	Analyse des PCR-Amplifikats nach Auftrennung in der Gelelektrophorese (Agarosegel 1,5 %).	75
Abb. 25:	Sequenzierungsergebnis des PCR-Amplifikats mit den Primern AQP1-LB42 (for) und AQP1-LB43 (rev).	76
Abb. 26:	Vektorkarte des pQE-TriSystems mit Markierung der verwendeten Schnittstellen.	77
Abb. 27:	Restriktionsanalyse des pQE-Vektors.	78
Abb. 28	Sequenzierungsergebnis zur Schnittstellenüberprüfung für <i>NcoI</i> (5'-CCA TGG-3') und <i>NotI</i> (5'-GCG GCC GCC-3') am AQP1-Fragment.(Murakami et al., 2000b).	79
Abb. 29:	Vektorkarte von pBlueScript KS II (+) mit Markierung der verwendeten Schnittstelle.	80
Abb. 30:	Vektorkarte von pGEM [®] -T Easy.	82
Abb. 31:	Blau-Weiss-Screening von transformierten <i>E. coli</i> DH5α.	83
Abb. 32:	Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA.	84
Abb. 33:	Plasmid-DNA nach Restriktion mit <i>EcoRI</i> in 1,5 % Agarosegel.	85
Abb. 34:	Sequenzierungsergebnis der aus dem Vektor pGEM [®] -T Easy isolierten Plasmid-DNA.	86
Abb. 35:	Vektorkarte von pGEM [®] -T Easy ligiert mit dem AQP1-Fragment.	87
Abb. 36:	Volumenänderungen während der Zellbewegung.	90
Abb. 37:	Übersicht zu chondrozytären Kanälen.	96

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Matrix-Metalloproteinasen der Knorpelmatrix und ihre Substrate.	10
Tab. 2:	Verwendete Chemikalien	24
Tab. 3:	Verwendete Medien	26
Tab. 4:	Verwendete Lösungen und Puffer.	27
Tab. 5:	Immunologische und molekularbiologische Anwendungspakete (Kits)	29
Tab. 6:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	30
Tab. 7:	Primärantikörper für Immunhistochemie (IHC) und Western Blot (WB)	31
Tab. 8:	Sekundärantikörper für IHC und WB	31
Tab. 9:	Isotypkontrollen für IHC	31
Tab. 10:	Verwendete Enzyme	32
Tab. 11:	Verwendete Plasmide*	33
Tab. 12:	Verwendete Oligonukleotide, nach Verfahren aufgeschlüsselt. Mit Angabe der Schmelztemperatur ($T_m[^\circ\text{C}]$).	34
Tab. 13:	Verwendete Geräte	36
Tab. 14:	Verwendete Computerprogramme	37

- Abramson, S.B., Attur, M., 2009. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 11, 227.
- Agre, P., King, L.S., Yasui, M., Guggino, W.B., Ottersen, O.P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., Nielsen, S., 2002. Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol. (Lond.)* 542, 3–16.
- Aigner, T., Fundel, K., Saas, J., Gebhard, P.M., Haag, J., Weiss, T., Zien, A., Obermayr, F., Zimmer, R., Bartnik, E., 2006. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54, 3533–3544.
- Aigner, T., Reichenberger, E., Bertling, W., Kirsch, T., Stöss, H., von der Mark, K., 1993. Type X collagen expression in osteoarthritic and rheumatoid articular cartilage. *Virchows Arch., B, Cell Pathol.* 63, 205–211.
- Aigner, T., Richter, W., 2012. OA in 2011: Age-related OA--a concept emerging from infancy? *Nat Rev Rheumatol* 8, 70–72.
- Aigner, T., Söder, S., 2008. Typisierung, Graduierung und Stadieneinteilung der Osteoarthrose: Histopathologische Begutachtung der Gelenkdegeneration. *Z Rheumatol* 67, 32-6, 38-40.
- Aigner, T., Stöve, J., 2003. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1569–1593.
- Alberts, B., Nover, L., Bronold, M. (Eds.), 2005. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*, 3rd edition. Wiley-VCH, Weinheim.
- Anthony, T.L., Brooks, H.L., Boassa, D., Leonov, S., Yanocho, G.M., Regan, J.W., Yool, A.J., 2000. Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 57, 576–588.
- Aszodi, A., Hunziker, E.B., Brakebusch, C., Fässler, R., 2003. Beta1 integrins regulate chondrocyte rotation, G1 progression, and cytokinesis. *Genes Dev.* 17, 2465–2479.
- Attur, M., Palmer, G., Tachida, Y., Kumakura, S., Shimada K., Abramson, S.B., 2011. Periostin, an osteoblast stimulating factor, regulates cartilage metabolism via MMP-13 activation, Osteoarthritis and Cartilage 19. S34A.
- Barrett-Jolley, R., Lewis, R., Fallman, R., Mobasheri, A., 2010. The emerging chondrocyte channelome. *Front Physiol* 1, 135.

- Baugé, C., Legendre, F., Leclercq, S., Elissalde, J.M., Pujol, J.P., Galéra, P., Boumédiène, K., 2007. Interleukin-1 β impairment of transforming growth factor β 1 signaling by down-regulation of transforming growth factor β receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 56, 3020–3032.
- Bell, D.M., Leung, K.K., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Ling, K.W., Sham, M.H., Koopman, P., Tam, P.P., Cheah, K.S., 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* 16, 174–178.
- Blanco Garcia, F J, 1999. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 7, 308–309.
- Blaschke, U.K., Eikenberry, E.F., Hulmes, D.J., Galla, H.J., Bruckner, P., 2000. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.* 275, 10370–10378.
- Blumer, Michael J F, Schwarzer, C., Pérez, M.T., Konakci, K.Z., Fritsch, H., 2006. Identification and location of bone-forming cells within cartilage canals on their course into the secondary ossification centre. *J. Anat.* 208, 695–707.
- Bondeson, J., Wainwright, S.D., Lauder, S., Amos, N., Hughes, C.E., 2006. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 8, R187.
- Borg, T.K., Markwald, R., 2007. Periostin: more than just an adhesion molecule. *Circ. Res.* 101, 230–231.
- Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A., Agre, P., 1999. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 425–458.
- Buck, T.M., Skach, W.R., 2005. Differential stability of biogenesis intermediates reveals a common pathway for aquaporin-1 topological maturation. *J. Biol. Chem.* 280, 261–269.
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J., 1998. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47, 477–486.
- Buckwalter, J.A., Martin, J., 1995. Degenerative joint disease. *Clin Symp* 47, 1–32.
- Butz, S., Okamoto, M., Südhof, T.C., 1998. A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain. *Cell* 94, 773–782.
- Calamita, G., 2000. The Escherichia coli aquaporin-Z water channel. *Mol. Microbiol.* 37, 254–262.
- Chadjichristos, C., Ghayor, C., Kypriotou, M., Martin, G., Renard, E., Ala-Kokko, L., Suske, G., Crombrughe, B. de, Pujol, J.-P., Galéra, P., 2003. Sp1 and Sp3

- transcription factors mediate interleukin-1 beta down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 39762–39772.
- Cheng, A., Van Hoek, A N, Yeager, M., Verkman, A.S., Mitra, A.K., 1997. Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature* 387, 627–630.
- Cohen, A.R., Woods, D.F., Marfatia, S.M., Walther, Z., Chishti, A.H., Anderson, J.M., Wood, D.F., 1998. Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J. Cell Biol.* 142, 129–138.
- Cooper, G.J., Boron, W.F., 1998. Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. *Am. J. Physiol.* 275, C1481-6.
- de Groot, Bert L, Frigato, T., Helms, V., Grubmüller, H., 2003. The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *J. Mol. Biol.* 333, 279–293.
- Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S., Woessner, J.F., 1989. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J. Clin. Invest.* 84, 678–685.
- Denker, B.M., Smith, B.L., Kuhajda, F.P., Agre, P., 1988. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.* 263, 15634–15642.
- Devuyst, O., Nielsen, S., Cosyns, J.P., Smith, B.L., Agre, P., Squifflet, J.P., Pouthier, D., Goffin, E., 1998. Aquaporin-1 and endothelial nitric oxide synthase expression in capillary endothelia of human peritoneum. *Am. J. Physiol.* 275, H234-42.
- Dieppe, P.A., Lohmander, L.S., 2005. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet* 365, 965–973.
- Dijkgraaf, L.C., de Bont, L G, Boering, G., Liem, R.S., 1995. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 53, 924–929.
- Dodds, G.S., 1930. Row formation and other types of arrangement of cartilage cells in endochondral ossification. *The Anatomical Record* 46, 385–399.
- Doherty, P.J., Zhang, H., Tremblay, L., Manolopoulos, V., Marshall, K.W., 1998. Resurfacing of articular cartilage explants with genetically-modified human chondrocytes in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* 6, 153–159.
- Drew, D., Fröderberg, L., Baars, L., de Gier, Jan-Willem L, 2003. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 3–10.
- Emans, P.J., Spaapen, F., Surtel, Don A M, Reilly, K.M., Cremers, A., van Rhijn, Lodewijk W, Bulstra, S.K., Voncken, J.W., Kuijer, R., 2007. A novel in vivo model to

- study endochondral bone formation; HIF-1alpha activation and BMP expression. *Bone* 40, 409–418.
- Eyre, D.R., 2004. Collagens and cartilage matrix homeostasis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, S118-22.
- Feng, W., Long, J.-F., Zhang, M., 2005. A unified assembly mode revealed by the structures of tetrameric L27 domain complexes formed by mLin-2/mLin-7 and Patj/Pals1 scaffold proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6861–6866.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372, 525–530.
- Froger, A., Hall, J.E., 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp*, 253.
- Funke, L., Dakoji, S., Bredt, D.S., 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 219–245.
- Gao, J., Wang, X., Chang, Y., Zhang, J., Song, Q., Yu, H., Li, X., 2006. Acetazolamide inhibits osmotic water permeability by interaction with aquaporin-1. *Anal. Biochem.* 350, 165–170.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T., 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 1531–1546.
- Gentili, C., Cancedda, R., 2009. Cartilage and bone extracellular matrix. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1334–1348.
- Geyer, M., Grässel, S., Straub, R.H., Schett, G., Dinser, R., Grifka, J., Gay, S., Neumann, E., Müller-Ladner, U., 2009. Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 328–335.
- Girkontaite, I., Frischholz, S., Lammi, P., Wagner, K., Swoboda, B., Aigner, T., von der Mark, K., 1996. Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies. *Matrix Biol.* 15, 231–238.
- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B., Blanchet, T., Ma, H.-L., Flannery, C.R., Peluso, D., Kanki, K., Yang, Z., Majumdar, M.K., Morris, E.A., 2005. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* 434, 644–648.
- Glasson, S.S., Askew, R., Sheppard, B., Carito, B.A., Blanchet, T., Ma, H.-L., Flannery, C.R., Kanki, K., Wang, E., Peluso, D., Yang, Z., Majumdar, M.K., Morris, E.A., 2004. Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum.* 50, 2547–2558.

- Goldring, M.B., 2012. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4, 269–285.
- Goldring, M.B., Goldring, S.R., 2007. Osteoarthritis. *J. Cell. Physiol.* 213, 626–634.
- Gresch, O., Engel, F.B., Nesic, D., Tran, T.T., England, H.M., Hickman, E.S., Körner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Müller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G., Lun, K., 2004. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods* 33, 151–163.
- Guerne, P.A., Carson, D.A., Lotz, M., 1990. IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *J. Immunol.* 144, 499–505.
- Haag, J., Gebhard, P.M., Aigner, T., 2008. SOX gene expression in human osteoarthritic cartilage. *Pathobiology* 75, 195–199.
- Haag, J., Voigt, R., Soeder, S., Aigner, T., 2009. Efficient non-viral transfection of primary human adult chondrocytes in a high-throughput format. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 813–817.
- Hagiwara, K., Shinozaki, T., Matsuzaki, T., Takata, K., Takagishi, K., 2013. Immunolocalization of water channel aquaporins in human knee articular cartilage with intact and early degenerative regions. *Med Mol Morphol* 46, 104–108.
- Hakuno, D., Kimura, N., Yoshioka, M., Mukai, M., Kimura, T., Okada, Y., Yozu, R., Shukunami, C., Hiraki, Y., Kudo, A., Ogawa, S., Fukuda, K., 2010. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. *J. Clin. Invest.* 120, 2292–2306.
- Halász, K., Kassner, A., Mörgelin, M., Heinegård, D., 2007. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 31166–31173.
- Hamilton, D.W., 2008. Functional role of periostin in development and wound repair: implications for connective tissue disease. *J Cell Commun Signal* 2, 9–17.
- Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R., Bosserhoff, A.K., 2002. Efficient transfection method for primary cells. *Tissue Eng.* 8, 235–245.
- Hannan, M.T., Felson, D.T., Pincus, T., 2000. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J. Rheumatol.* 27, 1513–1517.
- Hendriks, G., Koudijs, M., van Balkom, Bas W M, Oorschot, V., Klumperman, J., Deen, Peter M T, van der Sluijs, Peter, 2004. Glycosylation is important for cell surface expression of the water channel aquaporin-2 but is not essential for tetramerization in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 279, 2975–2983.

- Hirsch-Kauffmann, M., 1987. *Biologie für Mediziner, Pharmazeuten und Chemiker*. Thieme, Stuttgart, New York.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., 1952. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol. (Lond.)* 116, 497–506.
- Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L.F., Kudo, A., 1999. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1239–1249.
- Huang, W., Mabrouk, M.E., Sylvester, J., Dehnade, F., Zafarullah, M., 2011. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 gene in human osteoarthritic synovial membranes and its differential regulation by cytokines in chondrocytes. *Open Rheumatol J* 5, 81–87.
- Huebert, R.C., Vasdev, M.M., Shergill, U., Das, A., Huang, B.Q., Charlton, M.R., LaRusso, N.F., Shah, V.H., 2010. Aquaporin-1 facilitates angiogenic invasion in the pathological neovasculature that accompanies cirrhosis. *Hepatology* 52, 238–248.
- Hunter, D.J., 2011. Osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25, 801–814.
- Hunter, D.J., Felson, D.T., 2006. Osteoarthritis. *BMJ* 332, 639–642.
- Ikeda, T., Kawaguchi, H., Kamekura, S., Ogata, N., Mori, Y., Nakamura, K., Ikegawa, S., Chung, U.-i., 2005. Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J. Bone Miner. Metab.* 23, 337–340.
- Jacobsen, F., Mertens-Rill, J., Beller, J., Hirsch, T., Daigeler, A., Langer, S., Lehnhardt, M., Steinau, H.-U., Steinstraesser, L., 2006. Nucleofection: a new method for cutaneous gene transfer? *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 26060.
- Jung, J.S., Preston, G.M., Smith, B.L., Guggino, W.B., Agre, P., 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* 269, 14648–14654.
- Kaeck, S.M., Whitfield, C.W., Kim, S.K., 1998. The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor LET-23 in vulval epithelial cells. *Cell* 94, 761–771.
- Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J.-P., Fahmi, H., 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7, 33–42.
- Karlsson, C., Dehne, T., Lindahl, A., Brittberg, M., Pruss, A., Sittering, M., Ringe, J., 2010. Genome-wide expression profiling reveals new candidate genes associated with osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 18, 581–592.

- King, L.S., Choi, M., Fernandez, P.C., Cartron, J.P., Agre, P., 2001. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N. Engl. J. Med.* 345, 175–179.
- Knäuper, V., López-Otin, C., Smith, B., Knight, G., Murphy, G., 1996. Biochemical characterization of human collagenase-3. *J. Biol. Chem.* 271, 1544–1550.
- Kuettner, K.E., 1992. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin. Biochem.* 25, 155–163.
- Kühnel, W., 2002. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie, 11th edition. Thieme, Stuttgart.
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., Crombrughe, B. de, 1997. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1(\text{II})$ collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2336–2346.
- Lefebvre, V., Peeters-Joris, C., Vaes, G., 1990. Modulation by interleukin 1 and tumor necrosis factor α of production of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases and collagen types in differentiated and dedifferentiated articular chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1052, 366–378.
- Lewis, R., Feetham, C.H., Barrett-Jolley, R., 2011. Cell volume regulation in chondrocytes. *Cell. Physiol. Biochem.* 28, 1111–1122.
- Liang, H.-T., Feng, X.-C., Ma, T.-H., 2008. Water channel activity of plasma membrane affects chondrocyte migration and adhesion. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 7–10.
- Loeser, R.F., 2009. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthr. Cartil.* 17, 971–979.
- Loeser, R.F., Goldring, S.R., Scanzello, C.R., Goldring, M.B., 2012a. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64, 1697–1707.
- Loeser, R.F., Olex, A.L., McNulty, M.A., Carlson, C.S., Callahan, M.F., Ferguson, C.M., Chou, J., Leng, X., Fetrow, J.S., 2012b. Microarray analysis reveals age-related differences in gene expression during the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 64, 705–717.
- Löffler, G., 2005. Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie, 7th edition. Springer, Berlin.
- Löffler, G., Petrides, P.E., Löffler-Petrides, 2003. Biochemie und Pathobiochemie. Mit 218 Tabellen ; [mit Poster], 7th edition. Springer, Berlin.
- Loitto, V.M., Karlsson, T., Magnusson, K.-E., 2009. Water flux in cell motility: expanding the mechanisms of membrane protrusion. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 237–247.

- Lu, Y., Dhanaraj, S., Wang, Z., Bradley, D.M., Bowman, S.M., Cole, B.J., Binette, F., 2006. Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J. Orthop. Res.* 24, 1261–1270.
- Lyman J.R., Chappell J.D., Morales T.I., Kelley S.S., Lee G.M. Response of Chondrocytes to Local Mechanical Injury in an Ex Vivo Model. *Cartilage* v3 n1 (2012 02 22): 58-69.
- Ma, T., Yang, B., Gillespie, A., Carlson, E.J., Epstein, C.J., Verkman, A.S., 1998. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J. Biol. Chem.* 273, 4296–4299.
- Madry, H., Trippel, S.B., 2000. Efficient lipid-mediated gene transfer to articular chondrocytes. *Gene Ther.* 7, 286–291.
- Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.-P., Roughley, P.J., 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351–384.
- Martin, J.A., Ellerbroek, S.M., Buckwalter, J.A., 1997. Age-related decline in chondrocyte response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J. Orthop. Res.* 15, 491–498.
- Meng, J.-h., Ma, X.-c., Li, Z.-m., Wu, D.-c., 2007. Aquaporin-1 and aquaporin-3 expressions in the temporo-mandibular joint condylar cartilage after an experimentally induced osteoarthritis. *Chin. Med. J.* 120, 2191–2194.
- Mobasheri, A., Marples, D., 2004. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 286, C529-37.
- Mobasheri, A., Wray, S., Marples, D., 2005. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J. Mol. Histol.* 36, 1–14.
- Mohtai, M., Smith, R.L., Schurman, D.J., Tsuji, Y., Torti, F.M., Hutchinson, N.I., Stetler-Stevenson, W.G., Goldberg, G.I., 1993. Expression of 92-kD type IV collagenase/gelatinase (gelatinase B) in osteoarthritic cartilage and its induction in normal human articular cartilage by interleukin 1. *J. Clin. Invest.* 92, 179–185.
- Monzani, E., Bazzotti, R., Perego, C., La Porta, Caterina A M, 2009. AQP1 is not only a water channel: it contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin. *PLoS ONE* 4, e6167.
- Morales, T.I., 2007. Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthr. Cartil.* 15, 861–871.
- Muhammad, H., Rais, Y., Miosge, N., Ornan, E.M., 2012. The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2101–2107.

- Mülhardt, C., 2009. Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics, 6th edition. Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg.
- Murakami, S., Lefebvre, V., Crombrughe, B. de, 2000. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 275, 3687–3692.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., Fujiyoshi, Y., 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599–605.
- Myllyharju, J., Kivirikko, K.I., 2004. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 20, 33–43.
- Nagase, H., Kashiwagi, M., 2003. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. *Arthritis Res. Ther.* 5, 94–103.
- Nakazawa, T., Nakajima, A., Seki, N., Okawa, A., Kato, M., Moriya, H., Amizuka, N., Einhorn, T.A., Yamazaki, M., 2004. Gene expression of periostin in the early stage of fracture healing detected by cDNA microarray analysis. *J. Orthop. Res.* 22, 520–525.
- Norris, R.A., Damon, B., Mironov, V., Kasyanov, V., Ramamurthi, A., Moreno-Rodriguez, R., Trusk, T., Potts, J.D., Goodwin, R.L., Davis, J., Hoffman, S., Wen, X., Sugi, Y., Kern, C.B., Mjaatvedt, C.H., Turner, D.K., Oka, T., Conway, S.J., Molkentin, J.D., Forgacs, G., Markwald, R.R., 2007. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. *J. Cell. Biochem.* 101, 695–711.
- Nyblom, M., Oberg, F., Lindkvist-Petersson, K., Hallgren, K., Findlay, H., Wikström, J., Karlsson, A., Hansson, O., Booth, P.J., Bill, R.M., Neutze, R., Hedfalk, K., 2007. Exceptional overproduction of a functional human membrane protein. *Protein Expr. Purif.* 56, 110–120.
- O'Hara, B.P., Urban, J.P., Maroudas, A., 1990. Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 49, 536–539.
- Pandey, R.N., Yaganti, S., Coffey, S., Frisbie, J., Alnajjar, K., Goldstein, D., 2010. Expression and immunolocalization of aquaporins HC-1, -2, and -3 in Cope's gray treefrog, *Hyla chrysoscelis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 157, 86–94.
- Papadopoulos, M.C., Saadoun, S., Verkman, A.S., 2008. Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch.* 456, 693–700.
- Pawson, T., Nash, P., 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445–452.

- Peat, G., Thomas, E., Duncan, R., Wood, L., Hay, E., Croft, P., 2006. Clinical classification criteria for knee osteoarthritis: performance in the general population and primary care. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 1363–1367.
- Preston, G.M., Agre, P., 1991. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 11110–11114.
- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., Agre, P., 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385–387.
- Pujol, J.-P., Chadjichristos, C., Legendre, F., Bauge, C., Beauchef, G., Andriamanalijaona, R., Galera, P., Boumediene, K., 2008. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect. Tissue Res.* 49, 293–297.
- Qiu, W., Murray, M.M., Shortkroff, S., Lee, C.R., Martin, S.D., Spector, M., 2000. Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of alpha-smooth muscle actin. *Wound Repair Regen* 8, 383–391.
- Qureshi, H.Y., Ahmad, R., Zafarullah, M., 2008. High-efficiency transfection of nucleic acids by the modified calcium phosphate precipitation method in chondrocytes. *Anal. Biochem.* 382, 138–140.
- Raleigh, E.A., Trimarchi, R., Revel, H., 1989. Genetic and physical mapping of the *mcrA* (*rglA*) and *mcrB* (*rglB*) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* 122, 279–296.
- Rani, S., Barbe, M.F., Barr, A.E., Litvin, J., 2009. Periostin-like-factor and Periostin in an animal model of work-related musculoskeletal disorder. *Bone* 44, 502–512.
- Reboul, P., Pelletier, J.P., Tardif, G., Cloutier, J.M., Martel-Pelletier, J., 1996. The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 97, 2011–2019.
- Redini, F., Galera, P., Mauviel, A., Loyau, G., Pujol, J.P., 1988. Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett.* 234, 172–176.
- Rédini, F., Mauviel, A., Pronost, S., Loyau, G., Pujol, J.P., 1993. Transforming growth factor beta exerts opposite effects from interleukin-1 beta on cultured rabbit articular chondrocytes through reduction of interleukin-1 receptor expression. *Arthritis Rheum.* 36, 44–50.
- Reginato, A.M., Olsen, B.R., 2002. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res.* 4, 337–345.

- Reichenberger, E., Aigner, T., von der Mark, K., Stöss, H., Bertling, W., 1991. In situ hybridization studies on the expression of type X collagen in fetal human cartilage. *Dev. Biol.* 148, 562–572.
- Ren, G., Reddy, V.S., Cheng, A., Melnyk, P., Mitra, A.K., 2001. Visualization of a water-selective pore by electron crystallography in vitreous ice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1398–1403.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) (Ed.). *Arthrose. Gesundheitsberichterstattung.*
- Robert Koch-Institut (Hrsg). *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010". Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.* RKI, Berlin.
- Rosenberg, K., Olsson, H., Mörgelin, M., Heinegård, D., 1998. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J. Biol. Chem.* 273, 20397–20403.
- Rousseau, J.-C., Sornay-Rendu, E., Bertholon, C., Garnero, P., Chapurlat, R., 2013. Serum periostin is associated with prevalent knee osteoarthritis and predicts disease progression in women: The OFELY study, *Osteoarthritis and Cartilage* 21. S22A.
- Rowan, A.D., Koshy, P.J., Shingleton, W.D., Degnan, B.A., Heath, J.K., Vernallis, A.B., Spaul, J.R., Life, P.F., Hudson, K., Cawston, T.E., 2001. Synergistic effects of glycoprotein 130 binding cytokines in combination with interleukin-1 on cartilage collagen breakdown. *Arthritis Rheum.* 44, 1620–1632.
- Ruiz-Ederra, J., Verkman, A.S., 2006. Accelerated cataract formation and reduced lens epithelial water permeability in aquaporin-1-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3960–3967.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2005. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 434, 786–792.
- Saklatvala, J., 1986. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 322, 547–549.
- Sandell, L.J., Aigner, T., 2001. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* 3, 107–113.
- Schiebler, T.H., Peiper, U., Junqueira, Luiz Carlos Uchôa, 1984. *Histologie. Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen, unter Berücksichtigung der Histophysiologie.* Springer, Berlin u.a.
- Schulze-Tanzil, G., 2009. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: implications in cartilage injury and repair. *Ann. Anat.* 191, 325–338.

- Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P.J., Stock, C., 2012. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol. Rev.* 92, 1865–1913.
- Seeliger, D., Zapater, C., Krenc, D., Haddoub, R., Flitsch, S., Beitz, E., Cerdà, J., de Groot, Bert L, 2013. Discovery of novel human aquaporin-1 blockers. *ACS Chem. Biol.* 8, 249–256.
- Söder, S., Aigner, T., 2011. Arthrose. Ätiologie, Typisierung, Stadieneinteilung und histologische Graduierung. *Pathologe* 32, 183–192.
- Søgaard, R., Zeuthen, T., 2008. Test of blockers of AQP1 water permeability by a high-resolution method: no effects of tetraethylammonium ions or acetazolamide. *Pflugers Arch.* 456, 285–292.
- Spahn, G., 2006. Aktuelle Traumatologie. Thieme, Stuttgart.
- Stockwell, R.A., 1967. The cell density of human articular and costal cartilage. *J. Anat.* 101, 753–763.
- Stöve, J., Huch, K., Günther, K.P., Scharf, H.P., 2000. Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 68, 144–149.
- Tackmann, W., Tackmann, R., 2006. Zell- und Gewebelehre, 8th edition. Auxilium, Berlin.
- Tetlow, L.C., Adlam, D.J., Woolley, D.E., 2001. Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage: associations with degenerative changes. *Arthritis Rheum.* 44, 585–594.
- Tillmann, B., Leonhardt, H., Rauber, A., Kopsch, F., 1987. Bewegungsapparat. Hrsg. und bearb. von B. Tillmann. Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Trujillo, E., González, T., Marín, R., Martín-Vasallo, P., Marples, D., Mobasheri, A., 2004. Human articular chondrocytes, synoviocytes and synovial microvessels express aquaporin water channels; upregulation of AQP1 in rheumatoid arthritis. *Histol. Histopathol.* 19, 435–444.
- Ueblacker, P., Wagner, B., Vogt, S., Salzmann, G., Wexel, G., Krüger, A., Plank, C., Brill, T., Specht, K., Hennig, T., Schillinger, U., Imhoff, A.B., Martinek, V., Gansbacher, B., 2007. In vivo analysis of retroviral gene transfer to chondrocytes within collagen scaffolds for the treatment of osteochondral defects. *Biomaterials* 28, 4480–4487.
- van der Rest, M., Mayne, R., 1988. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J. Biol. Chem.* 263, 1615–1618.

- Verbavatz, J.M., Brown, D., Sabolić, I., Valenti, G., Ausiello, D.A., Van Hoek, A N, Ma, T., Verkman, A.S., 1993. Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study. *J. Cell Biol.* 123, 605–618.
- Verkman, A.S., 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell. Sci.* 118, 3225–3232.
- Verkman, A.S., 2008. Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert Rev Mol Med* 10, e13.
- Verkman, A.S., 2011. Aquaporins at a glance. *J. Cell. Sci.* 124, 2107–2112.
- Verkman, A.S., Mitra, A.K., 2000. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 278, F13-28.
- Wagner, S., Bader, M.L., Drew, D., Gier, J.-W. de, 2006. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends Biotechnol.* 24, 364–371.
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J.B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B.L., Agre, P., Engel, A., 1997. The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* 387, 624–627.
- Wang, M., Shen, J., Jin, H., Im, H.-J., Sandy, J., Di Chen, 2011. Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1240, 61–69.
- Welter, J.F., Solchaga, L.A., Stewart, M.C., 2004. High-efficiency nonviral transfection of primary chondrocytes. *Methods Mol. Med.* 100, 129–146.
- WHO, 2003. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. *World Health Organ Tech Rep Ser* 919, i-x, 1-218, back cover.
- Wistow, G.J., Pisano, M.M., Chepelinsky, A.B., 1991. Tandem sequence repeats in transmembrane channel proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16, 170–171.
- Wong, M., Carter, D.R., 2003. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 33, 1–13.
- Woolf, A.D., Pfleger, B., 2003. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* 81, 646–656.
- Xiang, Y., Ma, B., Li, T., Gao, J.-W., Yu, H.-M., Li, X.-J., 2004. Acetazolamide inhibits aquaporin-1 protein expression and angiogenesis. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 812–816.
- Yang, B., Kim, J.K., Verkman, A.S., 2006. Comparative efficacy of HgCl₂ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide. *FEBS Lett.* 580, 6679–6684.
- Zeidel, M.L., Ambudkar, S.V., Smith, B.L., Agre, P., 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31, 7436–7440.

- Zhang, H., Verkman, A.S., 2010. Aquaporin-1 tunes pain perception by interaction with Na(v)1.8 Na⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *J. Biol. Chem.* 285, 5896–5906.
- Zhu, S., Barbe, M.F., Amin, N., Rani, S., Popoff, S.N., Safadi, F.F., Litvin, J., 2008. Immunolocalization of Periostin-like factor and Periostin during embryogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 56, 329–345.

11 Anhang

11.1 Eigenständigkeitserklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Florstadt, den 25.07.2014

Unterschrift

11.2 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank den Patienten, die durch ihre Gewebespenden das Forschungsvorhaben ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. med. U. Müller-Ladner möchte ich zum einen für ein sehr lehrreiches und angenehmes Tertial in seiner Abteilung danken und zum anderen für die Gelegenheit zur Promotion.

Herrn Dr. med. M. Geyer danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das gezeigte Vertrauen und die Betreuung während der Promotion.

Frau Dr. rer. nat. E. Neumann und den Mitarbeitern des Franz-Groedel-Institutes möchte ich für ihre Aufgeschlossenheit und Hilfsbereitschaft danken.

Ganz besonders möchte ich Lucija für ihre Offenheit, ihr Engagement, ihre Herzlichkeit und nicht zuletzt ihre Freundschaft danken.

Es ist mir ein Anliegen, allen zu danken, die mein Studium mit Kind unterstützt haben. Danke der katholischen Kita in Jägersburg, danke liebe Frau Plietsch. Ich kann an dieser Stelle nicht alle Namen aufzählen, vergessen habe ich aber niemanden.

Liebe Marie, liebe Katrin danke für eure Hilfsbereitschaft, euren Zuspruch und eure Freundschaft.

Thorsten, danke für deine Unterstützung in Computerangelegenheiten und für die Sorgfalt beim Korrekturlesen.

Paul. Glück.

11.3 Lebenslauf